Untersuchungen über die Anwendung der Liquid-Phase-Peptidsynthese

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Wolfgang Schoknecht
aus Möllenbeck

1979

Untersuchungen über die Anwendung der Liquid-Phase-Peptidsynthese

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Wolfgang Schoknecht
aus Möllenbeck

1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 11. Juni 1979

Dekan: Prof. Dr. M. Hanack

1. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Bayer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Mutter

Meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Ernst Bayer am Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen durchgeführt.

Meinem sehr verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. Ernst Bayer danke ich für die Stellung des Themas, für sein stetes Interesse und für die großzügige Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

A b s t r a c t

Schoknecht, Wolfgang

Untersuchungen über die Anwendung der Liquid-Phase-Peptidsynthese.

An Hand der Sequenz 13-20 von Insulin B werden in verschiedenen Lösungsmitteln Peptide am Polyethylenglycol (POE) synthetisiert. Dabei stellt sich heraus, daß sich unpolare Lösungsmittel für kleine POE-Peptide und polare Lösungsmittel für größere POE-Peptide eignen. Gleichzeitig werden zwischen POE und Peptid verschiedene Ankergruppen eingebaut, um eine bessere Abspaltung des Peptids vom Polymer zu erreichen. Die besten Ergebnisse werden erzielt, wenn zwischen dem Polymer und dem p-Toluylanker Glycin eingebaut wird. Dies wird sowohl durch alkalische Hydrolyse als auch durch homogene Hydrogenolyse zur Abspaltung bestätigt.

Beim stufenweisen Aufbau des POE-Oktapeptids wird nach jedem Kupplungsschritt mit der C-13 NMR-Spektroskopie eine Sequenzanalyse gemacht, wobei eine eindeutige Zuordnung der einzelnen Kohlenstoffatome möglich ist. Es wird damit ein wichtiger Nachweis für den Erfolg einer Peptidsynthese am polymeren Träger gegeben.

Ebenso wird die Konformation des POE-Oktapeptids durch CD-Messungen bestimmt.

An Hand eines POE-Tripeptides wird der lineare Verlauf der Peptidkupplung mit einem Aktivester kinetisch verfolgt. Danach wird bei dieser Reaktion durch eine gezielte Metallsalzkatalyse eine Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit erreicht. Auch der Vergleich mit der analogen niedermolekularen Reaktion (Tripeptidester) mit dem Aktivester wird angegeben. Dadurch wird der Polymereinfluß (POE) auf die Peptidkupplung bestimmt.

INHALTSVERZEICHNIS

A)	EINLEITUNG	1
I.	Problematik der Peptidsynthese	2
I.1.	Strategie I	3
I.2.	Strategie II	3
I.3.	Strategie III	7
I.4.	Chemie des Insulins	11
II.	Synthese der Sequenz 13-20 von Insulin B am POE mit und ohne Ankergruppierung	13
II.1.	Synthesestrategie	13
II.2.	Synthesetaktik	13
II.3.	Synthese am Polyethylenglycol (MG = 3000)	15
II.3.1.	Polymerer Träger	15
II.3.2.	Veresterung	15
II.3.3.	Synthese der Sequenz 13-20 von Insulin B	16
II.3.4	Abspaltung und Isolierung des Oktapeptides	17
II.4.	Synthese der Sequenz 13-20 von Insulin B am Polyethylenglycol (20.000) unter Verwendung einer Ankergruppe	18
II.4.1.	Strategie und Taktik	18
II.4.2.	Veresterung von POE über Natriumpolyethylenglycol	20
II.4.3.	Einführen des p-Brommethylbenzylankers	20
II.4.4.	Durchführung der Synthese in Methylenchlorid	21
II.4.5.	Abspaltung vom polymeren Träger mittels Bromwasserstoff	22

II.5.	Synthese der Sequenz 13-20 von Insulin B am direkt verankerten Polyethylenglycol (20.000) in verschiedenen Lösungsmitteln	24
II.5.1.	Einführung der Ankergruppierung an das Polyethylenglycol	24
II.5.2.	Synthese der Sequenz 13-20 von Insulin B in Hexamethylphosphorsäuretriamid (HMPT)	25
II.5.3.	Abspaltung vom polymeren Träger mit Fluorwasserstoff	27
II.5.4.	Synthese der Sequenz 13-20 von Insulin B in Dimethylformamid	28
II.5.5.	Abspaltung vom polymeren Träger durch alkalische Hydrogenolyse (katalytisch)	29
II.5.6.	Abspaltung vom polymeren Träger durch alkalische, katalytische Hydrogenolyse unter Druck	30
II.5.7.	Synthese der Sequenz 13-20 von Insulin B in Dimethylsulfoxid	31
II.5.8.	Abspaltung durch homogene, alkalische, hydrogenolytische Katalyse	32
II.5.9.	Abspaltung durch homogene, hydrogenolytische Katalyse	33
II.5.10.	Abspaltung vom polymeren Träger durch homogene, hydrogenolytische, saure Katalyse	35
II.6.	Synthese der Sequenz 13-20 von Insulin B am polymeren Träger (POE) unter Einfügen einer Glycin-Anker-Gruppe	36
II.6.1.	Strategie und Taktik	36
II.6.2.	Veresterung des Polymers (POE) mit BOC-Glycin	36
II.6.3.	Einführen der Ankergruppe	36
II.6.4.	Durchführung der Synthese in Dimethylformamid	37
II.6.5.	Abspaltung vom polymeren Träger mittels homogener, hydrogenolytischer Katalyse	37
II.6.6.	Alkalische Abspaltung vom polymeren Träger	39

II.7.	Diskussion der Ergebnisse	40
II.7.1.	Lösungsmittel	40
II.7.2.	Die Ankergruppe	41
II.7.3.	Abspaltung vom POE-Anker bzw. POE	43
II.8.	Synthese der Sequenz 1-8 von Insulin B am polymeren Träger	44
II.8.1.	Synthesetaktik	44
II.8.2.	Veresterung am Polyethylenglycol (POE, MG = 20.000)	44
II.8.3.	Einführen der Ankergruppe	46
II.8.4.	Durchführung der Synthese in Methylenchlorid	46
II.8.5.	Alkalische Abspaltung vom polymeren Träger	47
III.	Konformation der Sequenz 13-20 von Insulin B am Polyethylenglycol	48
III.1.	Circulardichroismus	48
III.2.	CD-Spektrum der Sequenz 13-20 von Insulin B am Polyethylenglycol	49
IV.	C-13 NMR-Spektroskopie	56
IV.1.	C-13 NMR-Spektroskopie vom stufenweisen Aufbau des POE-Insulin B 13-20 und der Vergleich mit dem abgespaltenen, gereinigten Peptid	56
V.	Kinetik eines Polymerpeptides mit einem Aktivester unter gleichzeitiger Metallsalzkatalyse	69
V.1.	Einleitung	69
V.2.	Reaktionskinetik von Aktivestern mit einer Aminokomponente	71
V.3.	Polyethylenglycol (POE) als Kronenether	75
V.4.	Kinetische Untersuchungen	77
V.4.1.	Die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit bei Variation der Reaktionsbedingungen	78

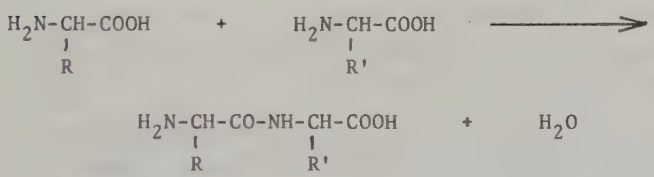
V.4.2.	Kinetik von BOC-GlyONP mit Gly_3-POE und Metallsalzkatalyse	81
V.4.3.	Variation der Metallsalzkonzentration	84
V.4.4.	Einfluß des Polyethylenglycols	86
V.4.5.	Erdalkalimetallsalzkatalyse	88
V.5.	Zusammenfassung der Kinetik	89
VI.	Experimenteller Teil	93
VI.1.	Abkürzungen	93
VI.2.	Verwendete Geräte	94
VI.3.	Chemikalien und Lösungsmittel	95
VI.4.	Aminosäurederivate	97
VI.5.	Analytik	97
VI.5.1.	Aminosäureanalyse	97
VI.5.2.	Dünnschichtchromatographie	98
VI.6.	Peptid-Synthese am Polymer	99
VI.6.1.	Veresterung von Polyethylenglycol mit BOC-Glycin	99
VI.6.2.	Abspaltung der BOC-Gruppe	101
VI.6.3.	Die Kupplung	101
VI.6.4.	Darstellung der Ankergruppen	102
VI.6.5.	Kupplung der C-terminalen Aminosäure an das Brombenzylpolymer	104
VI.6.6.	Synthese der Sequenz 13-20 von Insulin B am POE (3.000)	105
VI.6.6.1.	Abspaltung des Oktapeptides mittels alkalischer Hydrolyse	106
VI.6.7.	Synthese von POE-Gly-Anker-Insulin B 13-20 in CH_2Cl_2	108
VI.6.7.1.	HBr-Abspaltung vom polymeren Träger	109
VI.6.8.	Synthese von POE-Anker-Insulin B 13-20 in HMPT	111
VI.6.8.1.	HF-Abspaltung des Oktapeptides	112
VI.6.9.	Synthese von POE-Anker-Insulin B 13-20 in DMF	114
VI.6.9.1.	Alkalische Hydrogenolyse (katalytisch)	116

VI.6.9.2.	Alkalische Hydrogenolyse im Autoklaven	118
VI.6.10.	Synthese von POE-Anker-Insulin B 13-20 in DMSO	120
VI.6.10.1.	Abspaltung durch saure, homogene Hydrogenolyse (katalytisch)	121
VI.6.10.2.	Abspaltung vom polymeren Träger durch homogene, alkalische Hydrogenolyse	123
VI.6.10.3.	Abspaltung vom polymeren Träger durch homogene Hydrogenolyse	124
VI.6.11.	Synthese von POE-Gly-Anker-Insulin B 13-20 in DMF	125
VI.6.11.1.	Abspaltung durch homogene Hydrogenolyse	126
VI.6.11.2.	Alkalische Abspaltung vom Polymer (Hydrolyse)	127
VI.6.12.	Synthese von POE-Gly-Anker-Insulin B 1-8 in CH_2Cl_2	128
VI.6.12.1.	Alkalische Abspaltung vom Polymer	130
VI.6.13.	Synthese von POE-Gly_3·HCl	
VI.7.	Racemisierungstest	132
VII.	Zusammenfassung	133
B)	LITERATURVERZEICHNIS	135

EINLEITUNG

Die Aminosäuren haben als Grundelemente der Peptide und Proteine grundlegende Bedeutung in der Natur und an allen Lebensvorgängen. Peptide sind aus zwei oder mehreren Aminosäuren aufgebaute Verbindungen, in denen die Bausteine säureamidartig mit einander verknüpft sind. Die Knüpfung der Peptidbindung beruht formal auf der Acylierung der Aminofunktion einer Aminosäure durch eine zweite (s.Abb. 1).

Abb. 1



Um einheitliche Produkte zu erhalten, müssen die an der Reaktion nicht teilnehmenden funktionellen Gruppen geschützt werden. So erklärt sich die Tatsache, daß in den letzten Jahrzehnten verschiedene Methoden der Peptidsynthese entwickelt wurden.

Durch die Synthese kann der Beweis für die richtige Konstitution eines Peptides geführt werden. Die Modifizierung der Aminosäuresequenz während der Synthese kann wichtige Hinweise auf die Struktur und Wirkung der biologisch aktiven Peptide geben. So wurden auch schon Peptide gefunden, die eine höhere biologische Wirkung als ihre natürlichen Analoga haben.

I. Problematik der Peptidsynthese (1)

Es ist schon seit langem das erklärte Ziel der Peptidsynthese, natürlich vorkommende Peptide für pharmazeutische Zwecke mit biologischer Aktivität herzustellen. Es gibt mehrere Varianten, die alle mit mehr oder weniger Fehlern behaftet sind.

Man unterscheidet 3 Synthesestrategien:

Strategie I, die konventionelle Synthese, die den stufenweisen Aufbau von Peptidfragmenten und die Verknüpfung der Fragmente zum Gesamtpeptid vorsieht;

Strategie II, die Festkörpersynthese, bei der das Peptid stufenweise ohne Isolierung von Zwischenprodukten aufgebaut wird, und

Strategie III, die Synthese mit Hilfe löslicher polymerer Träger, die als Kombination zwischen Strategie I und II angesehen werden kann.

Eine ausführliche Zusammenfassung der Probleme der Peptidsynthese hat E. Wünsch gegeben (2). Es soll nun die Aufgabe dieser Arbeit sein, die Strategie III ausführlicher zu untersuchen, wobei folgende Schwerpunkte bearbeitet werden sollen:

1) Das Problem einer Ankergruppierung zwischen Polymer und C-terminaler Aminosäure
2) Synthese der Sequenz 13-20 von Insulin B in verschiedenen Lösungsmitteln
3) C^{13}-NMR-Untersuchungen am Polymerpeptid
4) Konformation des Polymerpeptides
5) Kinetik der Peptidkupplung nach der Aktivestermethode bei gleichzeitiger Metallsalzkatalyse

I.1. Strategie I

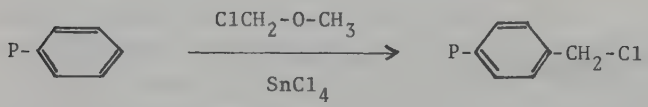
Die konventionelle Methode baut mit dem Schutz der Seitenkettenfunktionen der Aminosäure zunächst größere Peptidbruchstücke auf, die meist mit Hilfe der Azid-Methode zu größeren Einheiten verknüpft werden (3-7). Aber auch die Aktivester, wie die p-Nitrophenyl-(8), o-Nitrophenyl-(9), Hydroxysuccinimid(10)-ester, sowie symmetrische Anhydride, die mit Hilfe von Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) kondensiert werden, (11-13) finden eine breite Anwendung. In neuerer Zeit hat sich noch die Kombination 1-Hydroxybenzotriazol mit Dicyclohexylcarbodiimid durchgesetzt (14). Als Schutzgruppe für die Aminofunktion wird in den meisten Fällen die Z-(Carbobenzoxycarbonyl-) Gruppe (15) bzw. BOC-(t.-Butoxycarbonyl-)Gruppe (16-17) angewendet. Man beginnt in homogener Lösung mit der Acylierung eines Aminosäureesters, wobei durch einen geringen Überschuß der Carbonylkomponente für einen möglichst vollständigen Umsatz gesorgt wird. Durch Entfernen der Überschüsse und möglicher Nebenprodukte wird das entstandene Peptid gereinigt und charakterisiert. Schwierigkeiten treten nun dadurch auf, daß mit wachsender Kettenlänge die Löslichkeit des Peptids stark abnimmt (1) und zunehmende Schwierigkeiten bei der Reinigung auftreten. Trotzdem hat die klassische oder konventionelle Methode große Erfolge aufzuweisen, wie die Synthesen des Enkephalins (18), Human-(11 Leucin)-minigastrins I (19) Myoglobins (Teilsequenzen) (20), ACTH (21) und Insulins (22-24) beispielhaft zeigen.

I.2. Strategie II (25-29)

In der von Merrifield (25) eingeführten Festphasensynthese wird die C-terminale Aminosäure mit einem unlöslichen, schwach quervernetzten Polystyrol verestert und stufen-

weise N-Acylaminosäuren an die erste Aminosäure angebaut. Die Kupplung erfolgt mit Hilfe der DCC-Methode (11-13), bzw. Aktivester analog der klassischen Methode. Um nun Fehlsequenzen zu vermeiden, müssen große Überschüsse an aktivierter Aminosäure eingesetzt werden, die nach der Kupplung mit geeigneten Lösungsmitteln wieder leicht ausgewaschen und durch einfaches Filtrieren vom polymeren Träger abgetrennt werden können. Ebenso muß natürlich die Deblockierung der Aminofunktion quantitativ erfolgen, um Rumpf- bzw. Fehlsequenzen zu verhindern. Als Schutzgruppen für die Aminogruppe dienen meist die BOC-(16-17) bzw. Z-Gruppe (15). Um Fehlsequenzen zu vermeiden, werden nicht umgesetzte Aminofunktionen irreversibel blockiert, wobei dann höchstens Rumpfsequenzen auftreten, die leichter zu entfernen sind (30). Leider können Fehlsequenzen nie ganz verhindert werden. Das führt dazu, daß eine Abtrennung und Reinigung selbst bei kleinen Peptiden recht schwierig ist. Je länger das Peptid nun wird, desto schwieriger ist es mit den zur Verfügung stehenden analytischen Untersuchungsmethoden die Reinheit des Produkts festzustellen.

Als polymerer Träger dient oft ein Mischpolymerisat aus Styrol mit Divinylbenzol mit einem 1-2 %igem Vernetzungsgrad. Bei einer geringen Vernetzung des Divinylbenzol mit dem Polymer steigt das Quellvermögen und damit die Durchlässigkeit für Reagenzien (31). Um nun für viele Syntheseschritte eine kovalente, feste Bindung zwischen Peptid und Trägerharz herzustellen, führt man eine geeignete Ankergruppe ein.



P = Polystyrolgerüst

Im allgemeinen wird hier die leicht einzuführende Chlormethylgruppe angewendet.

Dann wird die C-terminale Aminosäure unter Benzylesterbindung mit dem unlöslichen, chlormethylierten Harz verknüpft.

$$Z\text{-}NH\text{-}CH(R)\text{-}COOH + Cl\text{-}CH_2\text{-}Ø\text{-}P \xrightarrow[-HCl]{N\,(C_2H_5)_3} Z\text{-}NH\text{-}CH(R)\text{-}CO\text{-}O\text{-}CH_2\text{-}Ø\text{-}P$$

Mit Hilfe der DCC-Methode (11-13) bzw. Aktivester (8-10) werden, nach Abspaltung der Aminoschutzgruppe (Z oder BOC), die nachfolgenden Aminosäuren gekuppelt, wobei die Aminkonzentration größer als 1 % sein muß, da sonst kein Umsatz stattfindet (42). Da nun einerseits quantitativer Umsatz und andererseits auch quantitative Deblockierung der Aminofunktion erfolgen muß, was in der Realität aber nicht verwirklicht werden kann. So können Rumpf- und Fehlsequenzen nie ganz vermieden werden. Zum Beispiel ergeben nicht umgesetzte Chlormethylgruppen, die nicht blockiert werden, bei nachfolgender Kupplung Fehl- bzw. Rumpfsequenzen. Es werden nun schwierige, zeitraubende Reinigungsprozesse notwendig, die oft nicht zum gewünschten Ziel führen (30, 32). Außerdem treten noch zusätzlich physikalische Probleme in Erscheinung. So ist die Diffusion der Kupplungskomponente in die feste Matrix beschränkt. Sie ist entweder aus sterischen oder solvatischen Gründen gehindert. Die heterogene Reaktion zwischen Polymer und Kupplungskomponente führt zu einer erheblichen Verlängerung der Reaktionszeit. Auch die Einführung von Phenol-Formaldehyd-(33-34) Pellicullar- (30, 35-37), Bürsten- (38) und modifizierten Sephadex-G 25-Harzen (39) brachte kaum eine Besserung. Um die, durch physikalische Gegebenheiten gesteckten Grenzen zu beseitigen,

haben Shemyakin et al. (40) den festen, mit Divinylbenzol quervernetzten Polystyrol-Träger der Merrifield-Technik durch ein lineares Polymer ersetzt, der es ihnen gestattete die Probleme der Diffusion auszuschalten. Die niedermolekularen Reaktionskomponenten wurden durch Ausfällen der Polymere abgetrennt, eine Operation, die nicht quantitativ verläuft und den Niederschlag oft in ungeeigneter physikalischer Form liefert.

Einen anderen Weg geht R.H. Andreatta (41). Als carboxyterminale, makromolekulare Schutzgruppe und zugleich als löslichkeitsvermittelnder Träger dient lineares monodisperses Polystyrol (Molekulargewicht 20.400). Dieses läßt sich durch Gelfiltration an Bio-Beads S-X1 von niedermolekularen Komponenten trennen. Gleiches gilt für sein chlormethyliertes Derivat und seine, mit geschützten Aminosäuren und Peptiden, esterartig verknüpften Derivate. Der Reaktionszyklus ist gleich, wie bei der noch zu besprechenden LPM (Liquid-Phase-Methode). Nachteilig ist, daß die Veresterung nicht quantitativ verläuft und auch Probleme bei der Abspaltung auftreten.

Alternierende Liquid-Solidphase-Peptid-Synthese (42-46)

Um beim Merrifield-Verfahren und seinen verschiedenen Variationen dem Zwang zu 100 %igen Umsätzen zu entgehen, hat H. Frank das Verfahren der alternierenden Fest-Flüssigphasen Peptidsynthese entwickelt, bei welcher die umgesetzte Verbindung von nicht umgesetzter Verbindung durch einfache Filtration getrennt wird. Bei jedem Reaktionsschritt erfolgt gleichzeitige Bindung des gewünschten Produkts an einen unlöslichen Träger oder dessen Abspaltung von einem unlöslichen Träger. Die Benzhydryloxycarbonylgruppe (PBOC), bei der ein Phenylring von vernetztem Polystyrol stammt, erwies sich bisher als beste polymergebundene Aminoschutzgruppe. Als Carboxylschutzgruppe wurden

bisher monofunktionelle Polyethylenglycole, der 4-Picolyl- und der Benzhydrylaminrest eingesetzt. Die Calcitoninsequenz M 28-32 wurde durch repetitive Anwendung der alternierenden Fest-Flüssigphasen Methode synthetisiert und in reiner Form erhalten. Neben der repetitiven Anwendung dieses Verfahrens zur Peptidsynthese erscheint seine Anwendung besonders auch in Kombination mit konventionellen Syntheseverfahren zur Umgehung einer schwierigen Trennoperation vorteilhaft. Ein anderes Verfahren haben G. Jung et al. (45-46) entwickelt.

I.3. Strategie III

1. Prinzip der Liquid-Phase-Methode

Die von M. Mutter und E. Bayer entwickelte Liquid-Phase-Methode (1), (47-53) basiert auf dem Umsatz einer N-terminal geschützten Aminosäure mit einem polymeren Träger, analog der Merrifield-Synthese, doch mit dem Unterschied, daß hier einige Nachteile der Festkörper-Methode durch die Löslichkeit des polymeren Trägers aufgehoben werden.

Als Polymer verwendet man Polyethylenglycole (POE) vom Molekulargewicht 5000-20.000. Je nach Strategie und Taktik werden die einzelnen Polyethylenglycole verschiedenen Molekulargewichts verwendet.

Drei Elemente treten bei der Liquid-Phase-Methode in den Vordergrund:

1) Die Reaktion verläuft in homogener Lösung. Es treten hier die Schwierigkeiten der Merrifield-Synthese mit dem heterogenen System nicht auf.
2) Die Kupplungen werden mit überschüssigen Reagenzien durchgeführt und können analytisch leicht überprüft werden.

3) Die überschüssigen Komponenten werden in homogener Phase entfernt, womit auch ein entscheidender Unterschied zur Festkörper-Methode zu Tage tritt. Das Polyethylenglycol kann auch als C-terminale Schutzgruppe betrachtet werden und macht das Peptid von Anfang an hochmolekular, so daß eine einfache Abtrennung der Überschüsse erfolgen kann. In der Anfangsphase wurde die Ultrafiltration benutzt (53-54).

Unterdessen konnte aber festgestellt werden, daß Polyethylenglycol mit Diethylether und Gemischen aus Diethylether/Ethanol, Diethylether/Methanol, Diethylether/Aceton und Diethylether/Essigester aus- und umkristallisiert werden kann ohne seine Eigenschaften zu ändern (55). Es fällt dabei als feinkristallines Produkt aus. Durch ein röntgenographisches Phasendiagramm konnte für das Polyethylenglycol eine Mäander-Struktur zugeordnet werden (56). Ein weiterer Vorteil der Liquid-Phase ist ohne Zweifel der geringere Zeitaufwand gegenüber den anderen Methoden und daß eine Automatisierung möglich ist (57-59).

2. Strategie der Liquid-Phase-Methode

Durch den Wegfall der beschränkenden Faktoren (lineare Kinetik im Gegensatz zur Merrifield-Synthese, Unlöslichkeit größerer Peptide bei der klassischen Synthese) kann bei der Liquid-Phase freier variiert werden. So wird das Peptid stufenweise vom C-terminalen Ende her aufgebaut und analytisch kontrolliert. Auf eine Zwischenreinigung des Peptides wird in den meisten Fällen verzichtet. Durch eine Abspaltung vom polymeren Träger ist sie aber prinzipiell möglich. Auch sind alle Schutzgruppen anwendbar, ohne daß irgendwelche Schwierigkeiten zu befürchten sind. Die N-geschützten Aminosäuren werden immer voraktiviert, wobei Aktivester oder symmetrische Anhydride besonders bevorzugt sind.

3. Analytik der Liquid-Phase-Methode

Da auf eine Zwischenreinigung bei der stufenweisen Synthese verzichtet wird, muß die Analytik nachweisen können, daß keine Nebenprodukte entstanden sind. Als Maß hierfür können die Aminogruppen herangezogen werden. Es sollten folgende Tatsachen zutreffen:

1) Quantitativer U msatz bei der Peptidkupplung.
   Hier dürfen bei den analytischen Nachweismethoden keine freien Aminogruppen mehr vorhanden sein.

2) Quantitative Deblockierung der Aminoschutzgruppe.
   Hier sollten dann alle Aminogruppen frei sein, da sonst im Verlauf der weiteren Synthese die Gefahr der Rumpf- bzw. Fehlsequenzbildung besteht.

Sollte nun eine dieser Bedingungen nicht auf Anhieb erfüllt sein, so besteht in der Liquid-Phase-Methode grundsätzlich die Möglichkeit, beliebig oft nachzukuppeln bzw. abzuspalten, bis nahezu ideale Verhältnisse vorliegen.

Es ist natürlich, daß diese Idealwerte auch mit Hilfe der Liquid-Phase nur annähernd erreicht werden, aber immerhin liegt man hier weit günstiger als bei der Merrifield-Synthese.

3) Das Produkt sollte von den Überschüssen befreit werden, da diese sonst ebenfalls mitreagieren, das Ergebnis verfälschen und quantitativen Umsatz bzw. Deblockierung vortäuschen können (60).

Folgende analytische Kontrollen sind möglich (60):

Radioaktiver Umsatztest (53)
Dansylmethode (61-66)
IR-Spektroskopie (53, 67)
Aminosäureanalyse (68)

Ninhydrintest (32, 53, 68-70)
Potentiometrische Titration (71-72)
Fluramtest (73-76, 64)

4. Synthesezyklus der Liquidphase-Methode

Die Synthesen in dieser Arbeit werden nach folgenden allgemeinen Gesichtspunkten durchgeführt.

1) Abspaltung der Schutzgruppe
Es wird nur die BOC-Gruppe als N-terminaler Schutz angewandt, die acidolytisch mit 1,2 n HCl/Eisessig bzw. TFA/ Methylenchlorid (1:1) 30 Minuten lang abgespalten wird.

2) Beladungsbestimmung
Die Beladung des Polymerpeptids wird durch Titration oder Aminosäureanalyse bestimmt.

3) Kupplung
Das Polymerpeptid wird in Methylenchlorid gelöst (10 %ige Lösung) und mit der voraktivierten Aminosäure (4-facher Überschuß an Anhydrid) versetzt. Dann wird mit der berechneten Menge N-Methylmorpholin neutralisiert, damit die Deprotonierung der Aminogruppe erfolgen kann.
Die Kupplungsdauer wird je Aminosäure frei variiert und erstreckt sich von 2-24 Stunden. Trotzdem muß meistens nachgekuppelt werden.

4) Entfernen der Überschüsse
Die Entfernung der Überschüsse erfolgt durch einfaches Umfällen mit Ethanol/ Diethylether, bis die Dünnschichtchromatographie ein sauberes Produkt anzeigt.

5) Umsatztest
Der Umsatz wird mit Fluram qualitativ und Titration bzw. Aminosäureanalyse quantitativ kontrolliert.

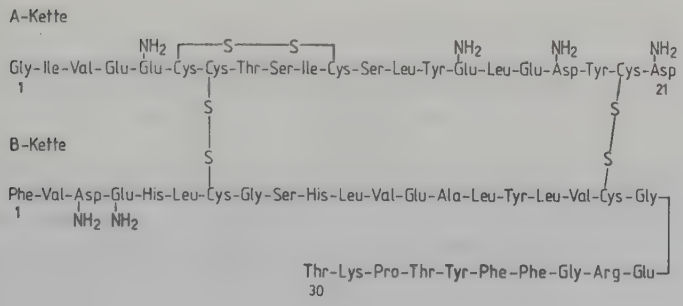
I.4. Chemie des Insulins (23-24)

Die Zuckerkrankheit, an der etwa 1 bis 2 % der Bevölkerung leiden, wird durch Insulinmangel verursacht.

Das Hormon Insulin wird in den ß-Zellen der Langerhansschen Inseln im Pankreas gebildet. Den Zusammenhang zwischen Diabetes mellitus und Insulin klärten v. Mehring und Minkowski.
Über die Entstehung der Diabetes weiß man wenig. Mit der Erkrankung ist die Unfähigkeit der ß-Zellen verbunden, Insulin überhaupt oder in ausreichenden Mengen abzugeben. Dieser Insulinmangel führt zum Anstieg des Glucose-Gehalts im Blut und nach Überschreiten der "Harnschranke" zum Auftreten von Glucose im Urin. Der Abbau von Glycogen und Neutralfett ist erhöht. Auch Eiweiß wird verstärkt abgebaut.

Umgekehrt normalisieren sich nach Insulinzufuhr die Blutglycosewerte oder es tritt sogar Hypoglykamie auf. Die Synthese von Glykogen, Fett und Eiweiß ist erhöht. Insulin wirkt somit anabol.
Die Bearbeitung der Insulinsynthese ist daher aus drei Gründen wichtig:

1) Der Chemiker will mit ihr die 1955 von Sanger (77) gefundene Strukturformel bestätigen (Abb. 2)



2) Der Biochemiker erhofft, speziell mit abgewandelten Insulinen Einblicke in die Wirkungsweisen dieses Hormons zu erlangen (78-80).

3) Der Mediziner wird vielleicht eines Tages auf synthetisches Insulin zur Behandlung von Diabetes mellitus angewiesen sein.

Schon in den Jahren 1902-1914 beschäftigte man sich mit Versuchen zur Extraktion eines antidiabetischen Prinzips aus Pankreas, doch erst 1921 waren Beuting und Best endgültig erfolgreich. Zusammen mit dem Biochemiker Collip wurde ein Verfahren erarbeitet, Insulin von den im Pankreas in großen Mengen vorhandenen proteolytischen Enzymen abzutrennen, die das Insulin zerstörten. Damit war die Grundlage für die medizinische Anwendung des Hormons und für die Beschäftigung mit der chemischen Natur dieser Substanz geschaffen. Dies führte zu Reindarstellung und Kristallisation, zur Ermittlung der chemischen Konstitution (77), der Raumstruktur (81-84) und zur ersten Synthese durch verschiedene Arbeitskreise (85-87). In der Folgezeit wurde an der Verbesserung der Ausbeute gearbeitet unter Verwendung neuer Schutzgruppen (88-91).

Auch Synthesen an polymeren Trägern wurden mit wechselndem Erfolg gemacht (92-94), wie auch die Synthese nach der Liquid-Phase-Methode zeigt (95-96).

II. Synthese der Sequenz 13-20 von Insulin B am POE mit und ohne Ankergruppierung

II.1. Synthesestrategie

Da die Liquid-Phase-Methode in mancher Hinsicht Vorteile gegenüber herkömmlichen Methoden aufweist, wird das Peptid nach dieser Methode synthetisiert. Mit der Wahl von POE (Molekulargewicht 3.000 bzw. 20.000) als löslichen Träger kann in homogener Lösung gearbeitet werden. Die Synthese wird in verschiedenen Lösungsmitteln wiederholt, um eventuelle Effekte zu beobachten. Es stehen sämtliche Schutzgruppen und Kupplungsmethoden zur Auswahl. Das Peptid wird stufenweise vom C-terminalen Ende her aufgebaut. Außer dem direkt am POE veresterten Peptid, werden mehrere Synthesen mit Einfügung einer Benzylankergruppe, welche säurelabil sein soll (97), durchgeführt, um Verluste an Peptid und Abspaltungsschwierigkeiten zu umgehen. Die Ausarbeitung dieser Methode wurde in Zusammenarbeit mit H. Albrecht (98) durchgeführt.

II.2. Synthesetaktik

Das zu synthetisierende Peptid hat folgendes Aussehen (99-100)

Gly-Cys(Bzl)-Val-Leu-Tyr(Bzl)-Leu-Ala-Glu(Bzl)BOC

20 19 18 17 16 15 14 13

Da im Molekül einige trifunktionelle Aminosäuren auftreten (Cystein, Tyrosin und Glutaminsäure), muß eine optimale Auswahl der Schutzgruppen getroffen werden.

Für die α-Aminofunktion, sämtlicher in der Synthese verwendeter Aminosäuren, wird die BOC-Gruppe (16-17) verwendet. Sie hat den Vorteil, daß sie leicht acidolytisch mit 1,2 n HCl/Eisessig bzw. 50 %iger Trifluoressigsäure in Methylenchlorid (101) entfernt werden kann.

Die phenolische Hydroxylgruppe des Tyrosins wird durch Verätherung mit der Benzylgruppe geschützt (102). Diese wird über den Kupferkomplex eingeführt (103) und dieser nach einer modifizierten Form zerstört (104). Die Abspaltung erfolgt entweder acidolytisch, z.B. mit Fluorwasserstoff (105-106) oder hydrogenolytisch (102).

Die γ-ständige Carboxylgruppe der Glutaminsäure wird durch Veresterung mit der Benzylgruppe ausreichend geschützt, da sie ja N-terminal ist. Die Abspaltung kann acidolytisch oder hydrogenolytisch erfolgen (107-108).

Der Schutz der Thiolgruppe von Cystein bereitet bis heute noch einige Schwierigkeiten, so daß immer wieder neue Schutzgruppen in der Literatur erscheinen (109-110). Besondere Beachtung finden die Acetamidomethyl-(111), Benzyl-(112), Benzhydryl-(113), 3,4 Dimethylbenzyl-(114) und S-Isopropyl-(SIP)-Gruppe (115). In den vorliegenden Synthesen wird die Benzylgruppe eingesetzt, da sie selbst der alkalischen und auch der acidolytischen Abspaltung standhält.

Durch die Wahl der Liquid-Phase-Methode bleibt einem der Schutz der C-terminalen Carboxylgruppe erspart, da ja das Polyethylenglycol (POE), als solche anzusehen ist. Die Abspaltung vom Polymer erfolgt alkalisch und bei Verwendung der später beschriebenen Ankergruppierungen, alkalisch, acidolytisch und hydrogenolytisch.

II.3. Synthese am Polyethylenglycol (MG = 3000)

II.3.1. Polymerer Träger

Als polymerer Träger wird Polyethylenglycol (POE) vom Molekulargewicht 3000 gewählt. Das käufliche POE wird mehrmals in reinem Ethanol umgefällt, um Verunreinigungen von vornherein auszuschließen. Danach wird am Hochvakuum gut getrocknet.

II.3.2. Veresterung

Die Veresterung der C-terminalen Aminosäure mit dem löslichen T räger wird mit Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) (symmetrisches Anhydrid) durchgeführt (11-13). Nachteilig ist die Veresterung mit dem 1-Hydroxybenzotriazolaktivester (14), der zwar die Racemisierung bei der Dicyclohexylcarbodiimid-Methode unterdrückt (116), aber unter Bildung eines Bisbenzotriazolethers mit dem Polyethylenglycol reagieren kann (117).

Die N-geschützte Aminosäure (Glycin) wird in der Kälte (0° C) mit Dicyclohexylcarbodiimid zum symmetrischen Anhydrid voraktiviert, wobei der Dicyclohexylharnstoff ausfällt, der leicht zu entfernen ist.

Unterdessen wird das Polyethylenglycol in Methylenchlorid aufgenommen (10 %ige Lösung), mit etwas Pyridin (Katalysator) versetzt und die voraktivierte Aminosäure hinzugegeben (5-facher Überschuß an Anhydrid). Die Lösung wird nun stark eingeengt, um den Konzentrationseffekt auszunützen. Es wird nun 3 Tage stehen gelassen, danach mit Diethylether ausgefällt, einrotiert und wieder in etwas Methylenchlorid aufgenommen und noch 1 Tag bei Raumtemperatur belassen. Dann wird mit Diethylether aus- und dreimal mit

Ethanol/Diethylether umgefällt. Es wird ein reines Produkt erhalten, was der Ninhydrin- (32, 53, 68-70) und Chlor/Tolidin-Test (118) bestätigen. Die durchgeführte Aminosäureanalyse erbringt eine Beladung von 75 %. Diese Beladung erscheint sinnvoll für die weitere Synthese.

II.3.3. Synthese der Sequenz 13-20 von Insulin B

Nachdem in der Einleitung I.4. beschriebenen Synthesezyklus wird nun die Synthese durchgeführt.

Die Voraktivierung der N-geschützten Aminosäure wird in der Kälte (0° C) in Methylenchlorid mit Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) zum symmetrischen Anhydrid durchgeführt. Diese Voraktivierung ist bei dieser Synthese für alle verwendeten Aminosäurederivate möglich .

Die Kupplung der N-geschützten Aminosäureanhydride mit dem Polymerpeptid wird in Methylenchlorid bis zum Tetrapeptid (Leucin) durchgeführt. Dann kann beim Ausfällen mit Diethylether kein kristallines Produkt mehr erhalten werden. Außerdem geht das Polymerpeptid auch nicht mehr in Lösung (2 Phasen). Es wird nun etwas Dimethylformamid zugesetzt. Aber auch dieses Lösungsmittel hat nur für den Kupplungsschritt Erfolg, da bei der nächsten Aminosäure (Tyrosin) zwar nicht beim Lösen, sondern beim Ausfällen die gleichen Schwierigkeiten wieder auftreten. Es wird nun eine ternäre Mischung Ethanol/Dimethylformamid/Diethylether (1:1:1) ausprobiert. Dieses hat dann einen Erfolg, wenn in der Kälte (0° C) noch soviel Diethylether hinzugetropft wird bis die ersten Anzeichen der Kristallisation eintreten, und dann am Rotationsverdampfer evakuiert wird, wobei der verdampfende Ether für weitere Abkühlung und damit zur Auskristallisation führt. Da die gleichen Schwierigkeiten auch beim Umfällen auftreten, geht durch das häufige Wiederholen dieser Methode etwa die Hälfte am Polymerpeptid verloren. Erst ab

dem Alanin tritt eine Besserung ein, und bei der Glutaminsäure sind es dann wieder gute Kristallisationseigenschaften mit der Kombination Dimethylformamid/Diethylether.

Die Deblockierung der Aminofunktion wird mit 1,2 n HCl/Eisessig durchgeführt.

Die durchgeführte Aminosäureanalyse erbringt befriedigende Ergebnisse:

	Glu	Gly	Ala	Val	Leu	Tyr	Cys(Bzl)
theor.	1	1	1	1	2	1	1
gef.	0.98	1.00	1.09	0.96	2.00	0.68	0.90

II.3.4. Abspaltung und Isolierung des Oktapeptides

Die Abspaltung des synthetisierten Oktapeptides vom löslichen Träger kann durch alkalische Hydrolyse, Aminolyse oder Hydrazinolyse erfolgen. Die Bedingungen entsprechen weitgehend denjenigen der klassischen Peptidsynthese. Die basische Abspaltung erfolgt mit 1 n Natronlauge (Kalilauge). Um eine homogene Phase herzustellen, wird etwas Dimethylformamid zugesetzt und gerührt. Die optimale Hydrolysedauer beträgt 4 Stunden, wobei mit der Dünnschichtchromatographie die Abspaltung gut verfolgt werden kann. Am Anfang ist nur der Startfleck mit dem Ninhydrintest sichtbar. Im Laufe der Abspaltung verblaßt dieser immer mehr, während der Peptidfleck deutlicher wird. Nach der Neutralisation (1 n HCl) wird das Peptid, welches wasserunlöslich ist, abzentrifugiert. Letzte Reste von POE werden durch säulenchromatographische Trennung an Sephadex LH 20 abgetrennt. Mit Chloroform wird der lösliche Träger extrahiert und die verbliebene Beladung mit der Aminosäureanalyse bestimmt.

Beladung vor der Hydrolyse:	80 %
Beladung nach der Hydrolyse:	4 %
Die Abspaltung erfolgt somit zu	94 %

Auch das abgespaltene Peptid zeigt sehr gute Ergebnisse in der Aminosäureanalyse:

	Glu	Gly	Ala	Val	Leu	Tyr
theor.	1	1	1	1	2	1
gef.	0.99	0.99	0.99	0.99	2	0.73

Die Ausbeute an reinem Peptid beträgt 20 % vom abgespaltenen Rohprodukt. Das ist ein gutes Ergebnis, da pro Chromatographie etwa ein Drittel an Peptid verloren geht.

Interessant ist es nun, noch die Racemisierung der einzelnen Aminosäuren zu testen. Die Bestimmung der Racemisierung (119-129) erfolgt nach E. Bayer et al. (125). Es ist mit höheren D-Anteilen bei der alkalischen Hydrolyse zu rechnen (130-131). Die Ergebnisse sind zwar etwas erhöht, aber noch im Rahmen des Vertretbaren.

	Ala	Val	Leu	Glu	Tyr
%-D	2.2	2.5	2.3	3.2	2.5

II.4. Synthese der Sequenz 13-20 von Insulin B am Polyethylenglycol (20.000) unter Verwendung einer Ankergruppe (98)

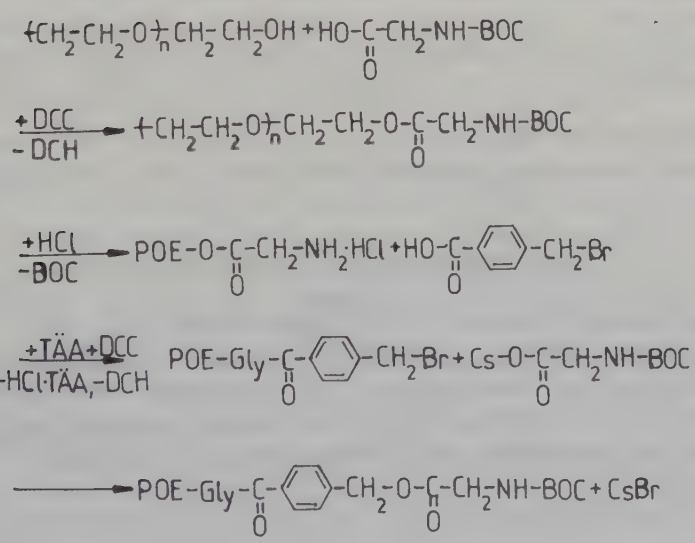
II.4.1. Strategie und Taktik

Bereits bei der Merrifield-Synthese hat es sich als sinnvoll erwiesen, durch Einschieben einer Ankergruppe, bessere Ergebnisse zu erzielen, da bei der acidolytischen De-

blockierung der Aminofunktion erhebliche Verluste an Peptid auftreten (132). Im Laufe der Jahre sind viele Zwischenglieder ausprobiert worden (133-140). A. Mitchell et al. (141) erreichen durch Einschieben einer Phenylacetamidomethylgruppe eine größere Stabilität der Benzylesterbindung gegenüber Trifluoressigsäure. In der Liquid-Phase-Methode wird eine Benzylesterankergruppe erstmals von I. Gatfield (97) eingeführt und von H. Albrecht (98) verbessert.

Einfache aliphatische Aminosäuren können fast quantitativ mit dem Polyethylenglycol (POE) verestert werden. An die endständige Aminogruppe kann p-Brommethylbenzoesäure, die durch direkte Bromierung von p-Toluylsäure unter Bestrahlung (143) leicht zugänglich ist, als symmetrisches Anhydrid (DCC-Methode) unter Ausbildung einer Säureamidbindung angehängt werden:

Abb. 3: Reaktionsschema für die Einführung der Ankergruppe in die Peptidsynthese



Die Abb. 3 stellt zunächst die Veresterung vom POE mit BOC-Glycin (Dicyclohexylcarbodiimid (DCC)-Methode) dar. Nach Entfernen der Aminoschutzgruppe wird an die Aminogruppe die p-Brom-Toluylsäure (DCC-Methode) ankondensiert. Die Knüpfung mit der C-terminalen Aminosäure Glycin erfolgt einfach, über dessen Cäsiumsalz.

II.4.2. Veresterung von POE über Natriumpolyethylenglycol (Na-OPOE)

Nach einer von M. Kutubuddin (144) entwickelten eleganten Darstellungsmethode, wird das Alkoholat des Polyethylenglycols dargestellt (Na-OPOE). Unterdessen wird BOC-Glycin mittels der Dicyclohexylcarbodiimid-Methode zum symmetrischen Anhydrid kondensiert. Beide Lösungen werden, unter Schutzgasspülung (Argon) und gleichzeitiger Entfernung des Dicyclohexylharnstoffs (DCH), vereinigt. Die Veresterung dauert 2 Tage unter Schutzgasatmosphäre, um eine befriedigende Beladung (95 %) zu erreichen. Eine analoge Durchführung mit BOC-Alanin ergibt eine Beladung von 94,5 % (Aminosäureanalyse). Da aber während dieser Synthese Racemisierungsgefahr besteht, da Natriumpolyethylenglycol stark basisch ist, wird ein Racemisierungstest durchgeführt (125).

Ergebnis: D-Ala 5,4 %

Somit bleibt diese Methode alleine auf das Glycin beschränkt.

II.4.3. Einführen des p-Brommethylbenzylankers

Die p-Bromtoluylsäure wird in Dimethylformamid gelöst und mit Dicyclohexylcarbodiimid zum symmetrischen Anhydrid (5-facher Überschuß) voraktiviert. Unterdessen wird das POE-Gly·HCl in DMF gelöst, beide Lösungen vereinigt und mit der berechneten Menge N-Methylmorpholin neutralisiert.

Als Umsatztest wird Fluramsprühreagenz verwendet (60, 73-76). Doch es zeigt sich, daß die Reaktion nur sehr langsam verläuft. Wahrscheinlich sind es sterische Effekte, die das verursachen. Zudem muß mehr Base, als errechnet, hinzugefügt werden, bis keine Aminogruppen mehr nachweisbar sind.

Auch die Umkristallisation bereitet große Schwierigkeiten, da die p-Brom-Toluylsäure, zwar in Diemthylformamid löslich ist, aber nicht in Methylenchlorid. Mehrmaliges Umfällen mit Dimethylformamid/Diethylether erbringt kein sauberes Produkt. Es wird nun in Methylenchlorid gelöst, wobei die überschüssige p-Brom-Toluylsäure durch Zentrifugieren abgetrennt wird. Letzte Reste werden durch Lösen in Ethanol und Zentrifugieren in der Kälte (0^{o} C) entfernt. Trotzdem ist dieses sehr zeitaufwendig, so daß anstatt der Säure in der nachfolgenden Synthese das Säurechlorid ausprobiert wird.

II.4.4. Durchführung der Synthese in Methylenchlorid

Über das Cäsiumsalz des BOC-Glycins (145) wird die Esterbindung zum Anker hergestellt, wobei das Salz in 5-fachem Überschuß in Diemthylformamid eingesetzt wird. Nach 1 Woche fällt das Cäsiumbromid aus, welches als Silbersalz nachweisbar ist. Es wird durch Zentrifugieren abgetrennt; auch hier ist die Aufarbeitung schwierig, da immer beim Umfällen mit Dimethylformamid/Diethylether bzw. Methylenchlorid/Diethylether weiteres Cäsiumbromid ausfällt, welches als Gleichgewichtsreaktion im Polyethylglycol komplexiert war.

Die Veresterung des Glycins am Anker wird mit der Aminosäureanalyse bestimmt.

Beladung am Anker 25 %.

Die Beladung von 25 % zeigt an, daß während der Reaktion noch etwas Wasser vorhanden war, so daß der Umsatz nicht vollständig ist. Dieses könnte über das Cäsiumsalz hineingekommen sein, da die Lyophilisation einige Schwierigkeiten bereitete.

Die Synthese wird trotz der geringen Beladung fortgeführt, um eventuelle Löslichkeits- und Kristallisationseffekte zu beobachten. Um mit der Synthese II.3.3. Vergleiche ziehen zu können, wird Methylenchlorid als Lösungsmittel verwendet. Dort hatten wir eine Beladung von 75 % und ab dem Pentapeptid Löslichkeits- und Kristallisationsschwierigkeiten. Dagegen treten bei einer Beladung von 25 % keine derartigen Schwierigkeiten auf. Dies läßt sich nur dadurch erklären, daß der löslich machende Effekt des Polyethylenglycols (POE) eindeutig überwiegt. Bei einer höheren Beladung tritt dagegen die Schwerlöslicheit des Peptides in den Vordergrund.

Die Aminosäureanalyse erbringt gute Ergebnisse.

	Cys(Bzl)	Val	Leu	Tyr	Ala	Glu	Gly
theor.	1	1	2	1	1	1	1
gef.	0.98	1.00	2.00	0.91	1.00	1.10	1.00

II.4.5. Abspaltung vom polymeren Träger mittels Bromwasserstoff (146)

Die Einführung des säurelabilen Ankers ermöglicht eine saure Abspaltung. Diese schonende Abspaltung läßt zudem erwarten, daß sich die Ergebnisse in Bezug auf Racemisierung der einzelnen Aminosäuren bessern. Das Polymerpeptid wird in etwas Trifluoressigsäure aufgenommen u nd eine Stunde bei Raumtemperatur mit Bromwasserstoff abgespalten. Etwas Anisol wird als "Scavanger" zugesetzt, um vorhandenes Brom abzufangen. Diese Bedingungen haben sich als brauchbar erwiesen. Nach Neutralisation mit einer ge-

sättigten Ammoniumhydrogencarbonatlösung wird das wasserunlösliche Peptid abzentrifugiert. Letzte Reste von POE und sonstiger Verunreinigungen werden durch eine säulenchromatographische Trennung an Sephadex LH 20 beseitigt. Das Anisol wird aus der wässrigen Lösung mit Diethylether und das POE danach mit Chloroform extrahiert. Durch die Aminosäureanalyse wird die verbliebene Beladung am Polymer bestimmt.

Beladung vor der Abspaltung:	25 %
Beladung nach der Abspaltung:	12,5 %
Die Abspaltung beträgt somit:	50 %

Es ist überraschend, daß die saure Abspaltung nur zu 50 % gelingt. Beim Einsatz des säurelabilen Ankers hatte man eine totale Abspaltung vom polymeren Träger erwartet. Eine Fluorwasserstoffabspaltung wird hier genauere Aufschlüsse liefern.

Aminosäureanalyse des Peptides:

	Gly	Glu	Ala	Val	Leu	Tyr
theor.	1	1	1	1	2	1
gef.	1.00	0.92	0.93	0.98	2.00	0.52

Racemisierungstest:

	Ala	Val	Leu	Tyr	Glu
%-D	2.2	1.9	1.8	1.0	1.3

Das Peptid zeigt gute Werte in der Analytik. Dagegen ist die Ausbeute von 10 % vom abgespaltenen Rohprodukt mager, da mit rund 20 % gerechnet wird. Der Grund hierfür ist, daß die säulenchromatographische Reinigung des Peptids an Sephadex LH 20 öfters wiederholt werden muß.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Synthese und Abspaltung verlaufen normal. Da die Verankerung mit der Säure aber recht zeitaufwendig ist, wird in der nachfolgenden Synthese das Säurechlorid der p-Bromtoluylsäure ohne Zwischenglied Glycin direkt an das Polyethylenglycol (POE) fixiert. Methylenchlorid als Lösungsmittel konnte wegen der geringen Beladung am Anker während der ganzen Synthese verwendet werden. Es hat gute Löslichkeitseigenschaften, und das Polymerpeptid kann auch gut umkristallisiert werden.

II.5. Synthese der Sequenz 13-20 von Insulin B am direkt verankerten Polyethylenglycol (20.000) in verschiedenen Lösungsmitteln

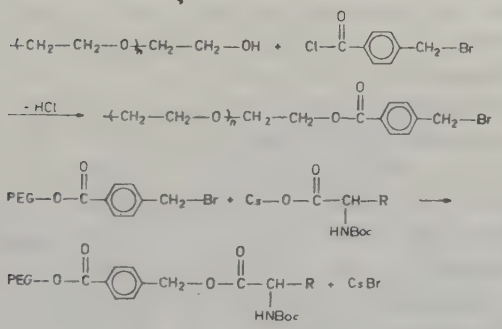
II.5.1. Einführung der Ankergruppierung an das Polyethylenglycol (58)

Das Säurechlorid der p-Bromtoluylsäure wird nach der Vorschrift von F. Vernon (147) dargestellt. Es wird Polyethylenglycol, das Säurechlorid und etwas Pyridin zur Chlorwasserstoffbindung in Toluol 24 Stunden am Rückfluß erhitzt und danach mit Diethylether gefällt. Das Umkristallisieren bereitet kaum Schwierigkeiten, da in Methylenchlorid das Säurechlorid unlöslich ist und durch einfaches Zentrifugieren entfernt werden kann.

Die Abb. 4 zeigt das Reaktionsschema für die Einführung der Ankergruppierung an das Polyethylenglycol und die Verknüpfung der C-terminalen Aminosäure mit dem Anker.

Abb. 4: Reaktionsschema

Abb. 4



II.5.2. Synthese der Sequenz 13-20 von Insulin B in Hexamethylphosphorsäuretriamid (HMPT)

a) Das Lösungsmittel HMPT (148):

Das bemerkenswerteste, polare, aprotische Lösungsmittel ist Hexamethylphosphorsäuretriamid (HMPT). Es ist eine farblose, leicht bewegliche Flüssigkeit, die sich mit Wasser in allen Mengenverhältnissen mischt. Auch mit vielen polaren und unpolaren organischen Lösungsmitteln ist es mischbar, außer gesättigten Kohlenwasserstoffen. Es ist nicht sehr giftig.

b) Durchführung der Synthese:

Die C-terminale Aminosäure (Glycin) wird wieder über das Cäsiumsalz (4-facher Überschuß) an die Ankergruppe gekuppelt. Damit die Reaktion möglichst vollständig abläuft, wird die Umsetzung bei 60° C zwei Tage lang durchgeführt. Es wird danach von ausgefallenem Cäsiumbromid durch dreimaliges Zentrifugieren abgetrennt. Die Beladung beträgt 70 % (Aminosäureanalyse). Die Deblockierung der Aminofunktion erfolgt mit 1,2 n HCl / Eisessig und die Kupplung wird mit Hilfe der symmetrischen Anhydride (Dicyclohexylcarbodiimid-Methode) durchgeführt. Auffallend ist, daß am Anfang der Synthese die Löslichkeit sehr schlecht ist. Man muß alle halbe Stunde wieder erwärmen (40° C), da sonst das Reaktionsprodukt ölig-kristallin ausfällt. Auf eine Konstanthaltung der Temperatur (40° C) wird wegen der Racemisierungsgefahr verzichtet. Schwierigkeiten treten auch beim A usfällen auf, wo das Abnutschen sehr beschwerlich ist. Nach gutem Nachwaschen mit Diethylether erhält man aber ein kristallines Produkt. Diese Schwierigkeiten nehmen im Laufe der Synthese deutlich ab, so daß ab Glutaminsäure bereits wieder normale Verhältnisse vorliegen. Trotz dieser Schwierigkeiten verlaufen Kupplungen und Deblockierung der Aminofunktion schnell und vollständig.

Hexamethylphosphorsäuretriamid ist somit ein Lösungsmittel, das in der Liquid-Phase-Methode sehr nützlich sein kann. Da es sehr polar ist, erklären sich auch die aufgetretenen Schwierigkeiten. Am Anfang der Synthese überwiegt der Einfluß des Polyethylenglycols, womit sich die schlechte Löslichkeit, öliges Ausfällen und schlechte Filtration erklären lassen. Je länger nun das Peptid wird, umso mehr tritt der Effekt des Peptides in den Vordergrund, was zur Besserung und schließlich zur Normalisierung der Synthesebedingungen führt. Man wird deshalb Hexamethylphosphorsäuretriamid (HMPT) bei Kupplung von langen Polymerpeptiden mit N-geschützten Aminosäuren einsetzen.

Aminosäureanalyse des Oktapeptides am Polymer:

	Gly	Val	Leu	Tyr	Ala	Glu
theor.	1	1	2	1	1	1
gef.	1.00	1.00	1.96	0.71	1.06	0.76

II.5.3. Abspaltung vom polymeren Träger mit Fluorwasserstoff (149-152)

Nachdem die Abspaltung mit Bromwasserstoff vom polymeren Träger nur zur Hälfte gelingt, wird versucht mit Fluorwasserstoff bessere Ergebnisse zu erzielen. Die Abspaltung mit Fluorwasserstoff wird in der Kälte (0^{o} C) eine Stunde durchgeführt, wobei der flüssige Fluorwasserstoff gleichzeitig als Lösungsmittel dient. Etwas Anisol wird als "Scavanger" zugesetzt (149-151). Nach Entfernen des Fluorwasserstoffs wird viel Wasser zugesetzt, mit einer gesättigten Ammoniumhydrogencarbonatlösung neutralisiert und das wasserunlösliche Peptid abzentrifugiert. Letzte Reste von POE werden durch säulenchromatographische Trennung an Sephadex LH 20 abgetrennt. Anisol wird aus der wässrigen Phase mit Diethylether, und das POE mit Chloroform extrahiert. Die Abspaltung vom polymeren Träger ist aber nicht vollständig wie die Aminosäureanalyse deutlich zeigt:

Beladung vor der Abspaltung: 61 %
Beladung nach der Abspaltung: 34 %

Die Abspaltung gelingt somit zu 44 %

Damit werden die Ergebnisse der Bromwasserstoffabspaltung bestätigt. Es deutet nun vieles darauf hin, daß der Anker weniger säurelabil ist, wie angenommen wurde. Durch eine analoge Fluorwasserstoffabspaltung werden die obigen Ergebnisse bestätigt, obwohl die Fluorwasserstoffbehandlung diesmal zwei Stunden durchgeführt wird.

Die aufgearbeiteten Peptide zeigen befriedigende Ergebnisse in der Analytik.

Aminosäureanalyse:

	Glu	Gly	Ala	Val	Leu	Tyr
theor.	1	1	1	1	2	1
gef.						
1. Absp.	1.00	1.00	1.00	1.00	2.00	0.5
2. Absp.	1.00	1.00	1.00	1.00	2.00	0.5

Auch der Racemisierungstest zeigt zufriedenstellende Ergebnisse:

	Ala	Val	Leu	Glu	Tyr
%-D					
1. Absp.	3.26	1.9	1.3	2.3	0.7
2. Absp.	2.2	1.9	1.4	2.9	1.1

Die Ausbeute an Peptid beträgt 18 % vom abgespaltenen Rohprodukt.

II.5.4. Synthese der Sequenz 13-20 von Insulin B in Dimethylformamid

Die C-terminale Aminosäure (Glycin) wird analog II.5.2. an die Ankergruppe gekuppelt. Auch hier muß das ausgefallene Cäsiumbromid mehrmals abzentrifugiert werden. Die Beladung wird zu 63 % bestimmt. Die Abspaltung der Aminoschutzgruppe erfolgt mit 1,2 n HCl/Eisessig. Die Kupplungen werden auch hier mit den symmetrischen Anhydriden (Dicyclohexylcarbodiimid-Methode) durchgeführt. Das Dimethylformamid ist ein ausgezeichnetes Lösungsmittel, wie es sich auch sehr gut zum Umfällen des Polymerpeptides eignet. Die Kupplungen und Deblockierungen der Aminofunktion erfolgen schnell und quantitativ. Das Dimethylformamid eignet sich somit

ausgezeichnet für die Synthese von Peptiden nach der Liquid-Phase-Methode. Die Grenze der Löslichkeit wird beim Oktapeptid noch nicht erreicht.

Die Aminosäureanalyse zeigt gute Ergebnisse, bis auf das Alanin, welches zu hoch erscheint.

	Glu	Gly	Ala	Val	Leu	Tyr
theor.	1	1	1	1	2	1
gef.	1.06	1.00	1.45	0.97	2.00	0.63

II.5.5. Abspaltung vom polymeren Träger durch alkalische Hydrogenolyse (katalytisch)

Nachdem die saure Abspaltung des Peptides vom polymeren Träger nur unbefriedigende Ergebnisse liefert, wird die katalytische, alkalische Hydrogenolyse getestet. Dazu wird das Polymerpeptid in einer Methanol/Triethylaminlösung mit einem Palladium/Aktivkohle-Katalysator 8 Stunden hydriert. Danach wird der Katalysator durch einfaches Filtrieren abgetrennt. Die klare Lösung wird einrotiert, und danach mit viel Wasser versetzt. Das wasserunlösliche Peptid wird abzentrifugiert und letzte Reste von POE mittels Säulenchromatographie an Sephadex LH 20 beseitigt. Das Polymer wird mit Chloroform aus der wässrigen Phase extrahiert.

Die Aminosäureanalyse gibt die verbliebene Beladung am Polymer an:

Beladung vor der Abspaltung: 63 %
Beladung nach der Abspaltung: 16 %

Die katalytische, alkalische Hydrogenolyse gelingt zu 74 %. Diese Abspaltungsart ist somit der sauren Hydrolyse (44 %) eindeutig überlegen.

Die Aminosäureanalyse des gereinigten Peptides zeigt befriedigende Ergebnisse.

	Glu	Gly	Ala	Val	Leu	Tyr
theor.	1	1	1	1	2	1
gef.	0.99	1.00	1.01	1.02	2.00	0.67

Der Racemisierungstest zeigt nur bei Valin und Glutaminsäure etwas zu hohe Werte:

	Ala	Val	Leu	Glu	Tyr
%-D	1.8	3.1	1.4	3.0	0.9

Die Peptidisolierung gelingt zu 10 %. Diese geringe Ausbeute erklärt sich dadurch, daß die Reinigung des Peptides mehrmaliges Chromatographieren erfordert.

II.5.6. Abspaltung vom polymeren Träger durch alkalische, katalytische Hydrogenolyse unter Druck

Die voranstehende Hydrierung ergab eine Abspaltung von 74 %. Es wird nun versucht dieses Ergebnis zu verbessern, indem die Hydrierung bei einem Druck von 50 Bar durchgeführt wird. Dazu wird das Polymerpeptid in einer Methanol/Triethylaminlösung mit einem Palladium/Aktivkohle-Katalysator 12 Stunden hydriert. Die Aufarbeitung geschieht analog II.5.5. Die verbliebene Beladung am Polymer wird durch die Aminosäureanalyse bestimmt.

Beladung vor der Abspaltung: 63 %
Beladung nach der Abspaltung: 4 %

Die alkalische, katalytische Hydrogenolyse unter Druck ergibt eine Abspaltung von 94 %. Sie ist damit vergleichbar mit der alkalischen Hydrolyse (94 %).

Das gereinigte Peptid kann in einer Ausbeute von 18 % vom abgespaltenen Rohprodukt isoliert werden.

Die Aminosäureanalyse zeigt befriedigende Werte für das Peptid.

	Glu	Gly	Ala	Val	Leu	Tyr
theor.	1	1	1	1	2	1
gef.	0.88	1.00	1.00	0.92	1.92	0.62

Beim Racemisierungstest treten wieder die leicht erhöhten D-Anteile vom Valin und der Glutaminsäure auf.

	Ala	Val	Leu	Glu	Tyr
%-D	2.1	3.5	1.4	3.1	1.2

Die alkalische Abspaltung mit Hilfe der Hydrogenolyse verläuft unter Druck somit fast quantitativ. Sie ist der entsprechenden Hydrogenolyse ohne Druck überlegen und erst recht den entsprechenden sauren Hydrolysen. Es werden noch andere Abspaltungen bei der nächsten Synthese getestet.

II.5.7. Synthese der Sequenz 13-20 von Insulin B in Dimethylsulfoxid (153)

a) Das Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO):

Das polare, aprotische Lösungsmittel Dimethylsulfoxid hat hohe Elektronendonatorfähigkeit und Polarität. Darauf beruht sein ausgezeichnetes und selektives Lösungsvermögen für eine Vielzahl organischer, auch polymerer Verbindungen, die Fähigkeit zur Wasserstoffbrückenbindung und Dipol-Dipol Assoziation. Die Struktur des Dimethylsulfoxids mit einem "harten" Sauerstoff- und einem "weichen" Schwefelatom bewirkt eine gute Kationen- und eine schlechte Anionensolvatation. Mischungen von Alkoholaten mit Dimethylsulfoxid gehören daher zu den basischsten Systemen der orga-

nischen Chemie und sind hervorragend zur Deprotonierung schwach acider Amin-, Hydroxyl- und CH-Bindungen, zu Eliminierungen und zur Auslösung von Polymerisationsreaktionen geeignet.

b) Durchführung der Synthese:

Die C-terminale Aminosäure (Glycin) wird analog II.5.2. an die Ankergruppe gekuppelt. Auch hier muß mehrmals beim Umfällen von neu ausgefallenem Cäsiumbromid abzentrifugiert werden.
Die Beladung wird zu 60 % bestimmt. Die Abspaltung der Aminoschutzgruppe erfolgt mit 1,2 n HCl/Eisessig. Die Kupplungen werden mit den symmetrischen Anhydriden (Dicyclohexylcarbodiimid-Methode) durchgeführt. Die Löslichkeit des Polymerpeptides im Dimethylsulfoxid ist vorzüglich, selbst bei längeren Peptiden. Auch die Kupplungen und Deblockierung der Aminofunktion verlaufen schnell und vollständig, und die Überschüsse lassen sich quantitativ abtrennen. Nachteilig ist nur, daß das Polymerpeptid beim Fällen mit Diethylether leicht ausölt, was aber mit zunehmender Kettenlänge des Peptids abnimmt. Die Kristallisation kann durch eine große Menge Diethylether unter gleichzeitigem Rühren erreicht werden. Abkühlen hat wegen des niederen Festpunktes (18° C) des Dimethylsulfoxids keinen Zweck.

Die Aminosäureanalyse gab diesmal nicht so gute Werte. So erscheinen Glycin und Valin etwas zu hoch im Verhältnis zu den anderen Aminosäuren. Glycin ist wieder der Bezugspunkt.

	Gly	Val	Leu	Tyr	Ala	Glu
theor.	1	1	2	1	1	1
gef.	1	1.00	1.65	0.78	0.77	0.80

II.5.8. Abspaltung durch homogene, alkalische, hydrogenolytische Katalyse (154)

E. Bayer und W. Schuhmann haben mit der Entwicklung eines Palladium-Schutzkolloid-Katalysators eine homogene Hydrogenolyse ermöglicht. Zunächst wird eine alkalische Wasserstoffabspaltung getestet, um sie mit den Ergebnissen der Palladium/Aktivkohle-Katalyse zu vergleichen. Das Polymerpeptid wird in einer Isopropanol/Triethylaminlösung gelöst, der Palladium-Schutzkolloid-Katalysator hinzugefügt und 30 Minuten unter Wasserstoffatomosphäre gerührt. Danach wird keine Wasserstoffaufnahme mehr festgestellt, was das Ende der Hydrierung anzeigt. Nach Entfernen des Katalysators mittels Ultrafiltration wird einrotiert und lyophilisiert. Die Abtrennung des polymeren Trägers von den niedermolekularen Anteilen geschieht mit der Säulenchromatographie an Sephadex LH 20. Dabei stellt sich heraus, daß der Katalysator kaputt geht und nur die Schutzgruppen abgespalten werden.
Die Aminosäureanalyse bestätigt, daß keine Abspaltung stattfindet.

Beladung vor der Abspaltung: 63 %
Beladung nach der Abspaltung: 63 %

II.5.9. Abspaltung durch homogene, hydrogenolytische Katalyse (154)

Da die alkalische, homogene Hydrogenolyse zu keinem Ergebnis führt, wird die Abspaltung im neutralen Medium durchgeführt. Dazu wird das Polymerpeptid in einer 50 %igen wässrigen Isopropanollösung aufgenommen, der Palladium-Schutzkolloid-Katalysator hinzugefügt und 30 Minuten unter Wasserstoffatomosphäre gerührt. Dann wird keine

Wasserstoffaufnahme mehr beobachtet. In der kurzen Hydrierdauer von 30 Minuten durch die homogene Hydrogenolyse zeigt sich auch der Vorteil dieser Methode gegenüber den üblichen Hydrierungen, die einen Zeitaufwand von 8-12 Stunden erfordern. Der Katalysator wird mittels Ultrafiltration entfernt. Die Abtrennung des polymeren Träger vom Peptid geschieht durch Säulenchromatographie an Sephadex LH 20.

Die Aminosäureanalyse gibt Auskunft über die restliche Beladung am Polymer.

Beladung vor der Abspaltung: 63 %
Beladung nach der Abspaltung: 33 %

Die Abspaltung beträgt somit 48 %, ähnlich wie bei der Fluor- und Bromwasserstoffabspaltung.

Das gereinigte Peptid konnte zu 20 % vom abgespaltenen Rohprodukt isoliert werden.

Die Aminosäureanalyse zeigt gute Werte.

	Glu	Gly	Ala	Val	Leu	Tyr
theor.	1	1	1	1	2	1
gef.	1	1.00	0.98	1.00	2.02	0.77

Der Racemisierungstest zeigt sehr gute Ergebnisse.

	Ala	Val	Leu	Glu	Tyr
%-D	1.5	1.6	1.4	1.5	0.5

II.5.10. Abspaltung vom polymeren Träger durch homogene, hydrogenolytische, saure Katalyse (154)

Da einerseits die alkalische, homogene Hydrogenolyse versagt, und andererseits die neutrale, homogene Hydrogenolyse nur zu 50 % gelingt, wird eine saure homogene Hydrogenolyse getestet. Dazu wird das Polymerpeptid in einer Isopropanol/Eisessig-Lösung aufgenommen, der Palladium-Schutzkolloid-Katalysator hinzugefügt und 30 Minuten in Wasserstoffatmosphäre gerührt, bis keine Wasserstoffaufnahme mehr festgestellt wird. Danach wird durch Ultrafiltration der Katalysator abgetrennt. Die Trennung des Peptides vom polymeren Träger erfolgt durch Säulenchromatographie an Sephadex LH 20.

Die Aminosäureanalyse zeigt die verbliebene Beladung am Polymer an.

Beladung vor der Abspaltung: 60 %
Beladung nach der Abspaltung: 33 %

Die homogene, saure, hydrogenolytische Katalyse erbringt 45 % Abspaltung des Peptids vom Polymer. Sie steht damit in gutem Einklang mit den vorangehenden sauren Abspaltungen, die maximal 50 % ergaben.

Die Aminosäureanalyse zeigt zufriedenstellende Ergebnisse für gereinigte Peptide. Glycin dient als Bezugspunkt.

	Glu	Ala	Val	Leu	Gly	Tyr
theor.	1	1	1	2	1	1
gef.	0.99	0.98	0.98	2.00	1.00	0.65

Der Racemisierungstest erbringt die erwarteten Werte.

	Ala	Val	Leu	Glu	Tyr
%-D	1.6	2.0	2.2	2.4	1.7

II.6. Synthese der Sequenz 13-20 von Insulin B am polymeren Träger (POE) unter Einfügen einer Glycin-Anker-Gruppe

II.6.1. Strategie und Taktik

Da nun in den vorausgegangenen Versuchen vor allem die Abspaltung nicht quantitativ erfolgt, wird probiert, durch Fixierung von Glycin zwischen dem Polyethylenglycol und der Benzylankergruppe, höhere Ergebnisse zu erzielen. Die Benzylankergruppe wird über das Säurechlorid der p-Brom-Toluylsäure an das polymer gebundene Glycin gekuppelt. Die weitere Synthese wird analog den vorangehenden Vorschriften gehandhabt.

II.6.2. Veresterung des Polymers (POE) mit BOC-Glycin

Die Veresterung der C-terminalen Aminosäure (Glycin) mit dem Polyethylenglycol wird analog den Vorschriften II.3.2. bzw. II.4.2. durchgeführt.

II.6.3. Einführen der Ankergruppe

Das mit Glycin veresterte Polyethylenglycol (POE-Gly·HCl) wird in Dimethylformamid gelöst, mit N-Methylmorpholin neutralisiert und mit dem p-Bromtoluylsäurechlorid zum Umsatz gebracht. Nach 2 Stunden beweist der Fluramtest den quantitativen Umsatz. Die Ausführung erfolgt mit Hilfe von Dimethylformamid/Diethylether-Gemischen, da das p-Bromtoluylsäurechlorid gut in Diethylether löslich ist.

II.6.4. Durchführung der Synthese in Dimethylformamid

Die C-terminale Aminosäure (Glycin) wird analog der Vorschrift II.5.2. wieder über das Cäsiumsalz an die Ankergruppe gekuppelt. Auch hier muß das ausgefallene Cäsiumbromid mehrmals abzentrifugiert werden. Die Beladung wird zu 55 % bestimmt. Die Abspaltung der Aminoschutzgruppe erfolgt mit 1,2 n HCl/Eisessig. Die Kupplungen werden auch hier mit den symmetrischen Anhydriden (Dicyclohexylcarbodiimid-Methode) durchgeführt. Dimethylformamid ist ein ausgezeichnetes Lösungsmittel, das sich auch sehr gut zum Umfällen des Polymerpeptides eignet. Die Kupplungen und Deblockierungen der Aminofunktion erfolgen schnell und quantitativ, wie auch die Beseitigung der noch vorhandenen Überschüsse.

Auch die durchgeführte Aminosäureanalyse zeigt gute Ergebnisse.

	Glu	Gly	Ala	Val	Leu	Tyr
theor.	1	2	1	1	2	1
gef.	1.00	2.33	0.95	1.07	2.00	1.00

II.6.5. Abspaltung vom polymeren Träger mittels homogener, hydrogenolytischer Katalyse (154)

An Hand der homogenen, hydrogenolytischen Abspaltung wird der Vergleich zwischen den beiden Varianten der Verankerung am Polymer gezogen. Bei der Hydrogenolyse des Peptides vom Ankerpolymer ohne das Zwischenglied Glycin haben wir ein Ergebnis von 48 % zu verzeichnen. Damit kann kein entscheidender Vorteil gegenüber der sauren Hydrolyse erreicht werden. Die Abspaltung des Peptides vom Ankerpolymer mit dem Zwischenglied Glycin erfolgt analog II.5.9. mit dem Unterschied, daß eine schnellere Wasserstoffaufnahme be-

obachtet wird. Die bessere Abspaltung zeigt auch die Hydrolysebestimmung durch die Aminosäureanalyse.

Beladung vor der Hydrogenolyse: 55 %
Beladung nach der Hydrogenolyse: 5 %

Die Abspaltung des Peptides vom polymeren Träger mit dem Zwischenglied Glycin durch die homogene, hydrogenolytische Katalyse gelingt zu 92 %, also fast quantitativ. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit den alkalischen Abspaltungsvarianten (94 %). Das reine Peptid zeigt gute Werte in der Aminosäureanalyse.

	Glu	Gly	Ala	Val	Leu	Tyr
theor.	1	1	1	1	2	1
gef.	0.96	1.04	1.04	0.97	2.00	0.82

Der Racemisierungstest zeigt die erwarteten Ergebnisse.

	Ala	Val	Leu	Glu	Tyr
%-D	1.2	1.4	1.3	1.5	1.1

Der Vorteil der homogenen Hydrogenolyse weist der Racemisierungstest nach. Alle D-Anteile der einzelnen Aminosäuren liegen unter 2 %. Damit ist diese Abspaltung auch den alkalischen Variaten überlegen, wo leicht erhöhte D-Anteile beim Valin bzw. bei der Glutaminsäure anzutreffen sind. Die nachfolgende alkalische Hydrolyse wird die Bestätigung hierfür erbringen.

II.6.6. Alkalische Abspaltung vom polymeren Träger

Die Abspaltung des synthetisierten Oktapeptides vom löslichen Träger geschieht durch eine alkalische Hydrolyse. Sie erfolgt mit 1 n Natronlauge (Kalilauge). Um eine homogene Phase zu erreichen, wird etwas Dimethylformamid zugesetzt und gerührt. Die optimale Hydrolysedauer beträgt 4 Stunden, wobei mit der Dünnschichtchromatographie die Abspaltung gut verfolgt werden kann. Am Anfang ist nur der Startfleck mit dem Ninhydrintest sichtbar. Im Laufe der Abspaltung verblaßt dieser immer mehr, während der Peptidfleck deutlicher wird. Nach der Neutralisation (1 n HCl) wird das wasserunlösliche Peptid abzentrifugiert. Letzte Reste von POE werden durch säulenchromatographische Trennung an Sephadex LH 20 abgetrennt. Mit Chloroform wird der lösliche Träger extrahiert und die verbliebene Beladung mit der Aminosäureanalyse bestimmt.

Beladung vor der Abspaltung:	55 %
Beladung nach der Abspaltung:	4 %

Die alkalische Hydrolyse gelingt zu 92,5 %. Das Ergebnis steht in gutem Einklang mit der alkalischen Hydrolyse ohne Ankergruppe zwischen Polymer und Peptid (94 %).

Das Peptid zeigt zufriedenstellende Ergebnisse in der Aminosäureanalyse:

	Glu	Gly	Ala	Leu	Val	Tyr
theor.	1	1	1	2	1	1
gef.	1.06	1.09	1.00	2.00	1.00	0.77

Der Racemisierungstest bestätigt die leicht erhöhten D-Anteile vom Valin und der Glutaminsäure

	Ala	Val	Leu	Glu	Tyr
%-D	2.1	3.1	1.4	3.1	1.2

II.7. Diskussion der Ergebnisse

II.7.1. Lösungsmittel

a) Methylenchlorid:

Das Lösungsmittel eignet sich ausgezeichnet zur Synthese von kleineren Polymerpeptiden. Das Polyethylenglycol (POE) läßt sich aus Gemischen mit Methylenchlorid und Diethylether sehr gut ausfällen. Auch Polymerpeptide (bis zum Tetrapeptid) lassen sich noch gut lösen und auskristallisieren (siehe II.3.3.). Beträgt die Beladung des Ankers nur 25 %, kann die Synthese bis zum Oktapeptid durchgeführt werden. Als Erklärung hierfür gilt, daß der Einfluß des Polyethylenglycols bei dieser geringen Beladung überwiegt, während bei einer Beladung des Ankers von 50-80 % mit wachsender Peptidlänge der Einfluß des Peptidanteils stetig wächst, und schließlich zu den beobachteten Löslichkeitsschwierigkeiten führt. Die Kupplungen, wie auch die Beseitigung der Überschüsse verlaufen schnell und quantitativ.

b) Dimethylformamid:

Das Lösungsmittel eignet sich für die Peptidsynthese am polymeren Träger hervorragend. Es zeichnet sich durch gute Löslichkeit und Kristallisation des Polymers und Polymerpeptids aus. Die Kupplungen und die Beseitigung der Überschüsse verlaufen schnell und quantitativ. Dimethylformamid wird dann eingesetzt, wenn die Synthese in Methylenchlorid versagt. Die Grenze der Löslichkeit wird aber beim Oktapeptid noch nicht erreicht (II.5.4.).

c) Dimethylsulfoxid:

Das polare Lösungsmittel Dimethylsulfoxid eignet sich dann gut für die Peptidsynthese an Polyethylenglycol, wenn der Einfluß des Peptides überwiegt, der zu den beobachteten Löslichkeitsschwierigkeiten in anderen Lösungsmitteln führt

(z.B. CH_2Cl_2). Überwiegt der Charakter des Polyethylenglycols, so treten beim Dimethylsulfoxid zwar keine Löslicheitsschwierigkeiten auf, auch verlaufen Kupplungen und Beseitigung der Überschüsse schnell und quantitativ, aber die Kristallisation bereitet große Schwierigkeiten. So ist es sinnvoll, dieses Lösungsmittel erst dann einzusetzen, wenn Dimethylformamid versagt (II.5.7.)

d) Hexamethylphosphorsäuretriamid (HMPT):

Das polare Lösungsmittel HMPT eignet sich dann besonders gut für die Peptidsynthese an Polyethylenglycol, wenn der Einfluß des Peptides weit überwiegt, der die Schwerlöslichkeit hervorruft. Überwiegt der Charakter des Polyethylenglycols, so treten beim HMPT sowohl Löslichkeitsschwierigkeiten, wie auch Kristallisationsschwierigkeiten auf. Trotzdem verlaufen Kupplungen und Beseitigung der Überschüsse schnell und quantitativ, wenn man bei 40° C arbeitet. So wird HMPT erst dann eingesetzt, wenn alle anderen Lösungsmittel versagen (II.5.2.).

Man wird also die Synthese in Methylenchlorid beginnen, dann in Dimethylformamid, in Dimethylsulfoxid und schließlich in HMPT fortsetzen. Bedingt durch die Sequenz lassen sich Löslichkeitsschwierigkeiten auch mit Hilfe der Konformation des Peptides erklären. So treten bei einem Übergang von der einen Konformation in die andere diese Löslichkeitschwierigkeiten auf.

II.7.2. Die Ankergruppe

Zunächst muß bei der Bromierung der p-Toluylsäure darauf geachtet werden, daß diese vollständig abläuft, da sonst eine geringere Beladung resultiert.

Die Kupplung des Anhydrids der p-Bromtoluylsäure an POE bzw. POE-Glycin bringt keine befriedigenden Ergebnisse. Erstens ist der Zeitaufwand sehr groß (1-2 Wochen) und zum anderen ist die Beseitigung der Überschüsse mit vielen Schwierigkeiten verbunden (II.4.3.).

Als bessere Möglichkeit hat sich hier das Säurechlorid der p-Bromtoluylsäure erwiesen. Es kann schnell und ohne Schwierigkeiten sowohl direkt an Polyethylenglycol (POE) gebunden werden (II.5.1.) als auch an POE-Glycin (II.6.3.). Da das p-Bromtoluylsäurechlorid gut in Diethylether löslich ist, bereitet auch die Beseitigung der Überschüsse keine Schwierigkeiten.

Der einzige problematische Schritt bei dieser Syntheseart ist der Umsatz des Cäsiumsalzes der Aminosäure mit dem Brom-Anker-Polymer. Einerseits muß bei der Lyophilisation des Cäsiumsalzes aufgepaßt werden, da es immer wieder auftaut, und andererseits muß es total wasserfrei sein, da sonst die Reaktion nicht vollständig abläuft. Außerdem bereitet die Abtrennung des ausgefallenen Cäsiumbromids Schwierigkeiten, da es in einer G leichgewichtsreaktion an das Polyethylenglycol komplexiert ist. Geht man vom polaren Dimethylformamid zum unpolaren Methylenchlorid, so fällt weiteres Cäsiumbromid aus. An sich stört es bei der Reaktion nicht. Bei Aktivestern, wie die p-Nitrophenylester wirkt das Cäsiumbromid an sich reaktionssteigernd, wie der Umsatz mit Polymerpeptiden zeigt. Am besten bewährt hat sich die Ankergruppe, wo zwischen Polyethylenglycol und Anker noch das Glycin zwischengeschaltet ist. Dies bestätigt auch die Abspaltung vom polymeren Träger.

In neuerer Zeit wird versucht einen 3-Nitro-4-Methyl-benzyl-Anker, der über das Anhydrid (DCC + 3-Nitro-4-Brom-Methylbenzoesäure) eingeführt wird, zu testen (155, 156). Die Abspaltung erfolgt hier photolytisch vom Anker. Auch die modifizierten Aminopolyethylenglycole mit verschiedenen Ankergruppierungen müssen noch generell getestet werden (157).

II.7.3. Abspaltung vom POE-Anker bzw. POE

Die Abspaltung des Oktapeptids, das ohne Ankergruppe an Polyethylenglycol verestert ist, gelingt durch alkalisches Medium zu 95 %. Die Aminosäureanalyse zeigt gute Werte für ein Peptid (II.3.4.), wobei die Racemisierung zwar leicht erhöht ist, aber noch im Rahmen des Vertretbaren liegt.

Die saure Abspaltung ist bei den Peptiden vom Anker-Polymer mit ungefähr 50 % unbefriedigend. Dabei spielt es keine Rolle, ob die Abspaltung am direkt ans Polymer fixierten Anker stattfindet oder nicht. Durchgeführt worden sind die Bromwasserstoff-Abspaltung am POE-Glycin-Anker (50 %, II.4.5.), die Fluorwasserstoff-Abspaltung am POE-Anker (44 %, II.5.3) und die homogene saure hydrogenolytische Abspaltung am POE-Anker (45 %, II.5.10). Die aufgearbeiteten Peptide sind chromatographisch rein, und zeigen gute analytische Werte.

Bessere Ergebnisse werden bei der alkalischen Abspaltung erzielt. Dabei gibt es verschiedene Varianten, die unterschiedliche Ergebnisse liefern. In der Racemisierung zeigen alle Varianten leicht erhöhte Werte für Valin und Glutaminsäure. Die analytischen Ergebnisse sind sehr zufriedenstellend. Durchgeführt worden sind die alkalische Hydrolyse (92,5 %, II.6.6.) am POE-Glycin-Anker, die alkalische hydrogenolytische Palladium-Aktivkohle-Katalyse (74 %, II.5.5.) und unter 50 Bar Druck (94 %, II.5.6.). Dagegen versagt die homogene alkalische, hydrogenolytische Katalyse (II.5.8.).

Als dritte Variante wird die homogene, hydrogenolytische Katalyse getestet. Sie zeigt deutlich, daß die Abspaltung vom POE-Gly-Anker (92 %, II.6.5.) wesentlich besser geht, wie vom POE-Anker (48 %, II.5.9.). Die erhaltenen Peptide sind analytisch rein.

Die Ausbeute an reinem Peptid kann nach der Aufarbeitung mit 20-25 % der Abspaltung angegeben werden. Es wird also sinnvoll sein, entweder eine alkalische Abspaltungsart bzw. die homogene, hydrogenolytische Katalyse durchzuführen, wobei eine Synthese am POE-Glycin-Anker eindeutig bessere Ergebnisse liefert.

II.8. Synthese der Sequenz 1-8 von Insulin B am polymeren Träger

II.8.1. Synthesetaktik

Das zu synthetisierende Peptid hat folgende Sequenz (238-245)

BOC-Phe-Val-Asn(MbH)-Gln(MbH)-His-Leu-Cys(Bzl)-Gly

1 2 3 4 5 6 7 8

Im Molekül treten einige trifunktionelle Aminosäuren auf (Cystein, Asparagin, Glutamin und Histidin). Es muß eine optimale Auswahl an Schutzgruppen getroffen werden. Für die α-Aminofunktion, sämtlicher in der Synthese verwendeter Aminosäuren, wird die BOC-Gruppe (16-17) verwendet. Sie hat den Vorteil, daß sie leicht acidolytisch mit 1,2 n HCl/Eisessig bzw. 50 %iger Trifluoressigsäure in Methylenchlorid (101) entfernt werden kann.

Der Schutz der Thiolgruppe des Cysteins wird auch hier mit der Benzylgruppe (112) erreicht.

Die Amidfunktion von Asparagin bzw. Glutamin wird mit der 4'4-Dimethoxybenzhydrylgruppe (MbH) von W. König und R. Geiger (236) geschützt.

II.8.2. Veresterung am Polyethylenglycol (POE, MG 20.000)

Die Veresterung der C-terminalen Aminosäure (Glycin) wird mit Hilfe der p-Nitrophenylaktivester (8) und gleichzeitiger Metallsalzkatalyse (Kaliumfluorid, vergleiche Kapitel V) durchgeführt.

Tabelle 1: Metallsalzkatalysierte Veresterung (KF)

Metallsalzkonz.	0	$5x10^{-4}M$	$2x10^{-3}M$
24 h	-	33 %	72 %
48 h	-	44 %	100 %

Die Tabelle 1 zeigt die Ergebnisse einer Probeveresterung von 1 g POE mit BOC-GlyONP in Acetonitril unter gleichzeitiger Metallsalzkatalyse, wobei die Konzentration aller Reaktionspartner 10^{-3} molar ist. Es ist deutlich zu sehen, daß auch hier die Katalyse bei einem 2:1 Komplex (Metallsalz : POE) zu einer totalen Veresterung führt. Dagegen reagiert das BOC-GlyONP mit dem Polyethylenglycol ohne Katalyse überhaupt nicht.

Die Veresterung wird nun in wesentlich höherer Konzentration der Reaktionspartner durchgeführt, liefert aber hervorragende Ergebnisse.

Gly = 1,26 M = 126 %

Die Beladung von 126 % am Polyethylenglycol erklärt sich auf eine einfache Weise. Die Berechnung wird auf ein Molekulargewicht von 20.000 durchgeführt und darf höchstens 100 % ergeben. Es muß nun angenommen werden, daß das Molekulargewicht wesentlich kleiner ist, und damit eine größere Beladung vortäuscht. Es wurden schon bei früheren Arbeiten solche Ergebnisse beobachtet. Da das Molekulargewicht zwischen 10.000 - 20.000 keinen Einfluß auf die weitere Synthese hat, kann ohne Schwierigkeiten weitergearbeitet werden.

II.8.3. Einführen der Ankergruppe

Das mit Glycin veresterte Polyethylenglycol (POE-Gly·HCl) wird in Dimethylformamid gelöst, mit N-Methylmorpholin neutralisiert und mit p-Bromtoluylsäurechlorid umgesetzt. Nach 2 Stunden beweist der Fluramtest quantitativen Umsatz. Die Aufarbeitung erfolgt mit Hilfe von Dimethylformamid/Diethylether-Gemischen, da das p-Bromtoluylsäurechlorid gut in Diethylether löslich ist.

II.8.4. Durchführung der Synthese in Methylenchlorid

Die C-terminale Aminosäure (Glycin) wird analog der Vorschrift II.5.2. wieder über das Cäsiumsalz an die Ankergruppe gekuppelt. Auch hier muß das ausgefallene Cäsiumbromid mehrmals abzentrifugiert werden. Die Beladung wird zu 61 % bestimmt. Die Abspaltung der Aminoschutzgruppe erfolgt mit 1,2 nHCl/Eisessig. Die Kupplungen werden mit den symmetrischen Anhydriden (Dicyclohexylcarbodiimid-Methode) durchgeführt. Bis zum Pentapeptid kann Methylenchlorid allein, dann im Gemisch (1:1) mit Dimethylformamid verwendet werden. Es treten keine Schwierigkeiten beim Lösen und Umfällen des Polymerpeptides auf. Die Kupplungen und Deblockierungen der Aminofunktion erfolgen schnell und quantitativ, wie auch die Beseitigung der Überschüsse.

Die Aminosäureanalyse zeigt die erwarteten Werte.

	Gly	Glu	Asp	His	Leu	Val	Phe
theor.	2	1	1	1	1	1	1
gef.	2.25	1.02	1.02	0.94	1.00	0.97	1.12

II.8.5. Alkalische Abspaltung vom polymeren Träger

Die Abspaltung des synthetisierten Oktapeptids vom löslichen Träger geschieht durch eine alkalische Hydrolyse. Es ist interessant festzustellen, ob eine Sequenzabhängigkeit bei der Abspaltung vorliegt. Die Hydrolyse erfolgt mit 1 n Natronlauge (Kalilauge). Um eine homogene Phase zu erreichen, wird etwas Dimethylformamid zugesetzt und gerührt. Die optimale Hydrolysedauer beträgt 4 Stunden, wobei mit der Dünnschichtchromatographie die Abspaltung gut verfolgt werden kann. Am Anfang ist nur der Startfleck mit dem Ninhydrintest sichtbar. Im Laufe der Abspaltung verblaßt dieser immer mehr, während der Peptidfleck deutlicher wird. Nach der Neutralisation (1 nHCl) wird das wasserunlösliche Peptid abzentrifugiert. Letzte Reste von POE werden durch säulenchromatographische Trennung an Sephadex LH 20 abgetrennt. Mit Chloroform wird der lösliche Träger extrahiert und die verbliebene Beladung mit der Aminosäureanalyse bestimmt.

Beladung vor der Abspaltung: 61 %
Beladung nach der Abspaltung: 4 %

Die alkalische Hydrolyse erbringt eine 94,5 %ige Abspaltung des Peptides vom polymeren Träger. Sie bestätigt damit die voranstehenden alkalischen Hydrolysen, die eine Abspaltung von 92,5-94 % erbrachten (vgl. II.3.4 und II.6.6.).

Die Aminosäureanalyse des Peptides zeigt gute Werte.

	Asp	Glu	Gly	Val	Leu	Phe	His
theor.	1	1	1	1	1	1	1
gef.	1.00	1.00	1.00	0.99	1.00	0.97	0.95

Der Racemisierungstest zeigt dagegen recht hohe D-Anteile.

	Val	Leu	Phe	Glu	Asp
%-D	2.2	3.4	3.7	8.9	21.6

Das Glutamin und Asparagin zeigen zu große Racemisierung, so daß eine alkalische Abspaltung hier nicht ratsam erscheint. Es wird sinnvoll sein, diese mit Hilfe der homogenen Katalyse zu vollziehen.

III. Konformation der Sequenz 13-20 von Insulin B am Polyethylenglycol

III.1. Circulardichroismus

Unterschiedliche Absorption von links- bzw. rechtscircular polarisiertem Licht beobachtet man bei Anwesenheit eines asymmetrischen Zentrums in Nachbarschaft zum Chromophor eines Moleküls (158). Das ist die Grundlage des Circulardichroismus (CD). Die asymmetrische Umgebung des Carbonylchromophors der Peptidbindung führt im fernen UV zu zwei CD-aktiven Elektronenübergängen, einem relativ schwachem $n\text{-}\pi^*$-Übergang und einem starken $\pi\text{-}\pi^*$-Übergang. Da die Wechselwirkung des Lichtes mit den Elektronen der Peptidbindung (Carbonylgruppe) von der Anordnung dieses Chromophors gegenüber anderen Molekülteilchen abhängt, bietet der Circulardichroismus die Möglichkeit, die verschiedenen Sekundärstrukturen der Peptide und Proteine zu untersuchen und zu analysieren.

Man unterscheidet nun zwischen α-, ß- und r.c.-Struktur (Random Coil = ungeordnete Sekundärstruktur), die sich im CD-Spektrum deutlich unterscheiden. Durch Vergleich mit bekannten Spektren läßt sich die Struktur des Peptides gut abschätzen (159-162).

III.2. CD-Spektrum der Sequenz 13-20 von Insulin B am Polyethylenglycol

Die Zahl der POE-Peptide, deren Konformation mittels CD bestimmt werden, steigt ständig (158, 163-167).

Eine empirische Vorhersage der Sekundärbereiche (α , ß, r.c., t = turn) kann mit Hilfe der Prediction Codes erreicht werden (168). P_α ist die Wahrscheinlichkeit für die Tendenz eines Aminosäurerestes in helikaler Konformation vorzuliegen. In Tabelle 2 sind die Helix-, ß-Struktur und ß-turn-Potentiale P_α , $P_ß$ und P_t der 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren mit folgender Klassifizierung angeordnet:

H_α = starker Helixbildner
h_α = Helixbildner
I_α = schwacher Helixbildner
i_α = indifferent bzw. Helixbildner
b_α = Helixbrecher
B_α = starker Helixbrecher

Tabelle 2 : P_α , $P_ß$ und P_t-Werte der 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren

As	P_α		As	$P_ß$		As	P_t
Glu (-)	1.53	H_α	Met	1.67	$H_ß$	Gly	1.68
Ala	1.45		Val	1.65		Asn	1.68
Leu	1.34		Ile	1.60		Ser	1.56
His (+)	1.24	h_α	Cys	1.30	$h_ß$	Pro	1.54
Met	1.20		Tyr	1.29		Asp (-)	1.26
Gln	1.17		Phe	1.28		Tyr	1.25
Trp	1.14		Gln	1.23		Cys	1.17
Val	1.14		Leu	1.22		Trp	1.11
Phe	1.12		Thr	1.20		Lys (+)	1.01
Lys (+)	1.07	I_α	Trp	1.19	$I_ß$	Arg (+)	1.00
Ile	1.00		Ala	0.97		Thr	1.00
Asp (-)	0.98	i_α	Arg (+)	0.90	$i_ß$	Phe	0.71
Thr	0.82		Gly	0.81		His (+)	0.69
Ser	0.79		Asp (-)	0.80		Met	0.67
Arg (+)	0.79		Lys (+)	0.74		Ile	0.58
Cys	0.77		Ser	0.72		Ala	0.57
Asn	0.73	b_α	His (+)	0.71	$b_ß$	Gln	0.56
Tyr	0.61		Asn	0.65		Leu	0.53
Pro	0.59	B_α	Pro	0.62		Glu (-)	0.44
Gly	0.53		Glu (-)	0.26	$B_ß$	Val	0.30

Es gelten nun folgende empirische Regeln für die Vorhersage:

1) Für jedes Segment von 6 oder mehr Aminosäuren mit $\langle P_\alpha \rangle > 1.03$ und $\langle P_\alpha \rangle > \langle P_\beta \rangle$ wird die α-Helix erwartet.

2) Für jedes Segment von 5 oder mehr Aminosäuren mit $\langle P_\beta \rangle > 1.05$ und $\langle P_\beta \rangle > \langle P_\alpha \rangle$ wird die ß-Struktur vorhergesagt.

3) ß-turns: Die Wahrscheinlichkeit, daß ein Tetrapeptid in einer Sequenz als ß-turn vorliegt ist groß, wenn $\langle P_\alpha \rangle < 0.90$, $\langle P_t \rangle > \langle P_\beta \rangle$ und $P_t > 0.5 \cdot 10^{-4}$ ist.

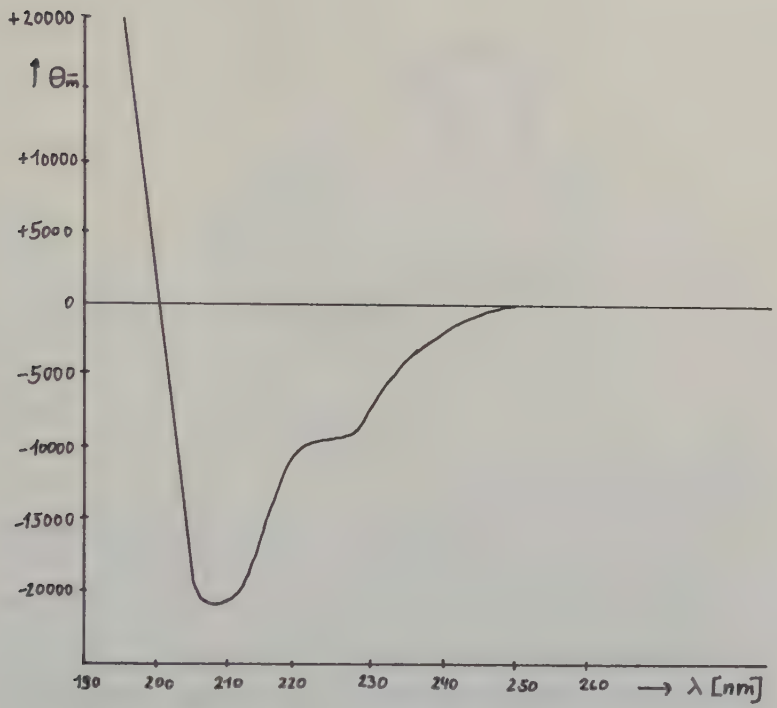
Über einige Nebenbedingungen, die auch erfüllt sein müssen, siehe bei H. Mutter (166).

Das Peptid hat folgendes Aussehen:

POE-	Gly-	Cys(Bzl)-	Val-	Leu-	Tyr(Bzl)-	Leu-	Ala-	Glu(Bzl)
P_α	0.53	0.77	1.14	1.34	0.61	1.34	1.45	1.53
$\langle P_\alpha \rangle$ = 1.09								
P_β	0.81	1.30	1.65	1.22	1.29	1.22	0.97	0.26
$\langle P_\beta \rangle$ = 1.09								

Auf Grund der Vorhersage ist eine sekundäre Struktur zu erwarten, jedoch ist eine Spezifizierung dieser Struktur nicht möglich.

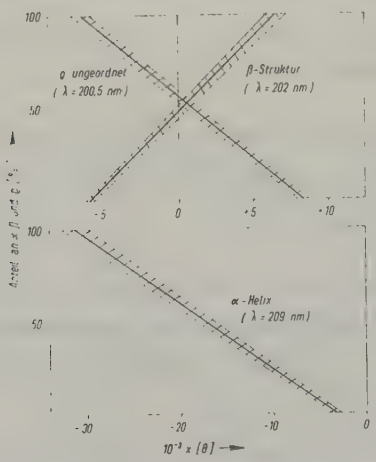
Abb. 5: CD-Spektrum des POE-Oktapeptides in TFE
(1 mg Peptid / 1 ml TFE) Gerät: JASCO



a) Auswertung nach Rosenkranz (160)

Zur Vereinfachung der Berechnung werden unter Verwendung der von Myer angegebenen Gleichung (169) Nomogramme aufgestellt (siehe Abb. 6). Der prozentuale Anteil an α-, ß-, und r.c.-Struktur kann direkt aus der Elliptizität abgelesen werden.

Abb. 6: Nomogramme zur Berechnung des prozentualen Anteils an α-, ß-, und r.c.-Struktur



Auf Grund dieser Nomogramme ergibt sich folgende prozentuale Zusammensetzung:

α = 55 %
r.c. = 45 %

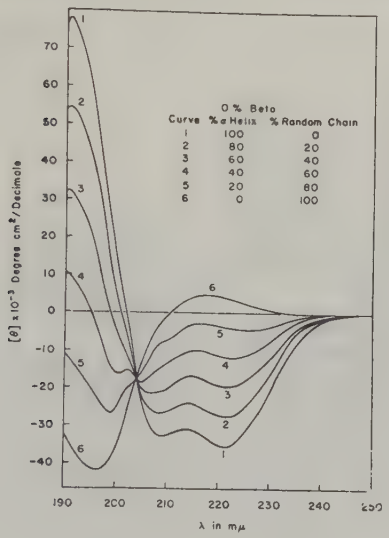
b) Auswertung nach Fasman (159)

Der prozentuale Anteil an α-Helix kann einfach errechnet werden nach:

$$\% \alpha = \frac{[\theta]\ 208\ nm - 4}{33 - 4}$$

$$= 58\ \%$$

Abb. 7: Prozentuale Anteile an r.c. und α und ß



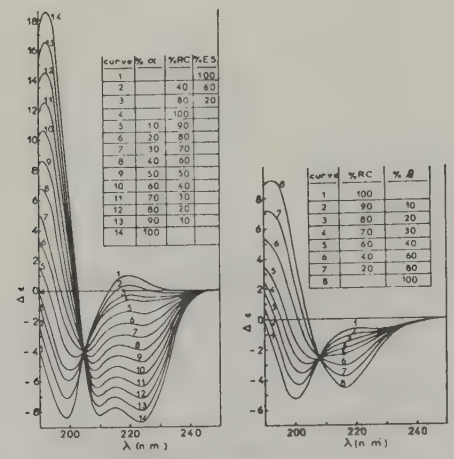
Der Nulldurchgang und auch das Minimum bei 208 nm (π - π^* Übergang für die α-Struktur) bestätigen durchaus den α-Anteil. Jedoch zeigt der Vergleich zwischen experimenteller und berechneter CD-Kurve gravierende Unterschiede oberhalb von 208 nm (208-240 nm). So ist der θ $\bar{m}$-Wert der berechneten CD-Kurve bei 223 nm (n- π^* Übergang bei α-Struktur) um einiges kleiner als der von der exprimentellen Kurve. Auf Grund dieser Tatsache erscheint eine qualitative Aussage eher auf folgende prozentuale Anteile der Sekundärstruktur hinzudeuten.

α = 40 %
r.c. = 60 %

c) Auswertung nach Domard (161):

Hier wird durch einfachen Vergleich der berechneten Kurven (siehe Abb. 7) auf die prozentualen Anteile der Konformation geschlossen.

Abb. 7: Prozentuale Anteile an r.c., ß und α



Auch hier deuten der Nulldurchgang und das Minimum bei 208 nm auf 60 % α hin. Der Vergleich zwischen experimenteller und berechneter CD-Kurve weist aber oberhalb von 208 nm (bis 240 nm) gravierende Unterschiede auf. So kommt der $\Theta\overline{m}$-Wert der berechneten Kurve bei 223 nm (n-π^+ Übergang bei der α -Struktur) deutlich verändert gegenüber der experimentellen Kurve. Auf Grund dieser Tatsache erscheint eine qualitative Aussage eher folgende prozentuale Anteile der Sekundärstruktur in Betracht zu ziehen.

α = 40 %
r.c. = 60 %

Zusammenfassung:

Alle drei angewendeten Verfahren deuten beim Nulldurchgang und beim Minimum von 208 nm ($\pi - \pi^+$) auf folgende prozentuale Anteile hin:

α = 55 %
r.c. = 45 %

Bei den Verfahren nach Domard und Fasman spricht aber eine wichtige Tatsache dagegen. Dort zeigt der Vergleich von experimenteller und berechneter CD-Kurve oberhalb von 208 nm (208-240) gravierende Unterschiede im Kurvenverlauf. Der $\theta\bar{m}$-Wert der berechneten Kurve stimmt mit dem $\theta\bar{m}$-Wert der experimentellen K urve bei 223 nm ($n - \pi^+$ Übergang bei der α-Struktur) nicht überein. Somit könnte folgende Konformation sinnvoll sein:

α = 40 %
r.c. = 60 %

IV. C-13 NMR-Spektroskopie (170-172)

Die C-13 NMR Untersuchungen an Peptiden (173-180) nehmen einen immer größer werdenden Raum ein. Zunächst einmal dienten sie zur reinen Identifizierung von kleinen Peptiden und Aminosäurederivaten, wo die einzelnen Kohlenstoffresonanzen noch eindeutig zugeordnet werden konnten. In der heutigen Zeit können an Hand der C-13 NMR Untersuchungen auch Konformationsbestimmungen von Peptiden in Lösung gemacht werden (181-183).

Auch an Polyethylenglycol gebundene Peptide sind schon untersucht worden und Aussagen über die Konformation gemacht worden (158, 266).

Es ist Aufgabe dieser Arbeit den stufenweisen Aufbau des Oktapeptides der Insulin B Sequenz 13-20 am Polyethylenglycol (POE, MG = 3.000) mit Hilfe der C-13 NMR-Spektroskopie zu verfolgen und eine eindeutige Zuordnung der Resonanzen zu erzielen. Man darf diesen Nachweis auch gleichzeitig als Erfolg für das Gelingen der Synthese ansehen. Der Vergleich mit dem abgespaltenen, gereinigten Peptid wird die Bestätigung erbringen.

IV.1. C-13 NMR-Spektroskopie vom stufenweisen Aufbau des POE-Insulin B 13-20 und der Vergleich mit dem abgespaltenen, gereinigten Peptid

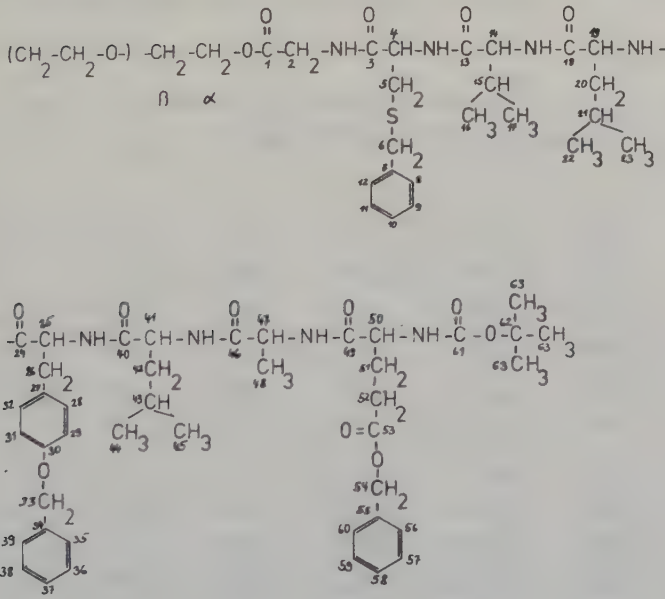
Um gute vergleichbare C-13-NMR-Spektren zu erhalten, muß das Molekulargewicht des Polyethylenglycols (POE) klein sein (MG = 3.000), damit die Peptidkonzentration relativ groß ist. Die Synthese, wie auch die Abspaltung des Peptides vom polymeren Träger werden in Kapitel II.3. beschrieben. Die Messungen werden am Bruker WH 90-Gerät durchgeführt. Bis zum Hexapeptid wird in $CDCl_3$, dann in d_7-Dimethylformamid gemessen.

In der Abb. 8 wird die Primärstruktur des POE-Oktapeptides wiedergegeben. In Abb. 9 wird die Nummerierung der Kohlenstoffatome für die Zuordnung der C-13 NMR-Resonanzen angegeben.

Abb. 8:

POE-Gly-Cys(Bzl)-Val-Leu-Tyr(Bzl)-Leu-Ala-Glu(Bzl)-BOC

Abb. 9: Schematische Darstellung des POE-Oktapeptides für die Zuordnung



Die Tabelle 3 zeigt die ppm-Werte der C-13-NMR-Resonanzen während der Synthese und vom abgespaltenen Produkt. Die Aufnahme der Spektren erfolgt nach jedem Kupplungsschritt. Die ppm-Werte sind so geordnet, daß sie von links nach rechts den Fortlauf der Synthese darstellen. Der letzte Wert in dieser Reihe stammt vom abgespaltenen Peptid. Es treten einige Resonanzen auf, die nicht eindeutig zugeordnet werden können. Dabei sind die Werte, die nicht zugeordnet werden können und die gleichen ppm-Werte besitzen durch ein charakteristisches Zeichen gekennzeichnet (z.B. ⊕, X, O). Die Zuordnung ist dann auch umgekehrt möglich. Teilweise fallen die Resonanzen auch in den Bereich des Lösungsmittels (z.B. DMF - d_7). Diese ppm-Werte werden durch das Zeichen LM gekennzeichnet. Die Zuordnung von C-41 ist in der 7. Messung nicht vollständig geklärt.

Tabelle 3: C-13 Resonanzen während der Synthese und vom abgespaltenen Produkt in ppm

POE	69.8	70.1	69.9	70.2	70.4
	70.5	70.9	70.9	---	
- C	63.4	64.0	63.7	64.0	64.2
	64.6	64.7	64.7	---	64.2
ß-C	68.4	68.4	68.2	68.8	68.7
	68.8	69.2	69.2	---	68.7
Glycin					
1 C = O	169.7	169.0	168.7	169.2	169.4
	169.1	170.3	170.4	171.4	
2 CH_2	41.7	41.0	40.7	40.8	40.8
	40.6	41.2	41.0	41.9⊕	

S-Benzyl-Cystein

3 C=O	---	170.6	170.1	170.4	170.7
	171.2	171.7	172.8	172.2	
4 CH	---	53.0	52.7	52.4	52.3
	52.5	51.2	51.0	50.8	
5 CH_2	---	33.5	32.8	32.8	33.2
	33.6	33.6(LM)	33.6.(LM)	33.8(LM)	
6 CH_2	---	36.1	35.7	36.0	36.1
	36.1^{x}	36.8^{x}(LM)	36.3^{x}(LM)	36.9^{x}(LM)	
7 C_{arom}	---	137.5	137.5	137.7	137.9
	138.2	139.3	139.3	139.2	
8+12 CH_{ort}	---	128.1	127.9	127.9	128.5
	128.6	129.2	129.2	129.0	
9+11 CH_{met}	---	128.6	128.5	128.6	128.9
	129.1	129.7	129.7	129.6	
10 CH_{para}	---	126.7	126.5	126.7	126.9
	126.9	127.5	127.6	127.4	

Valin

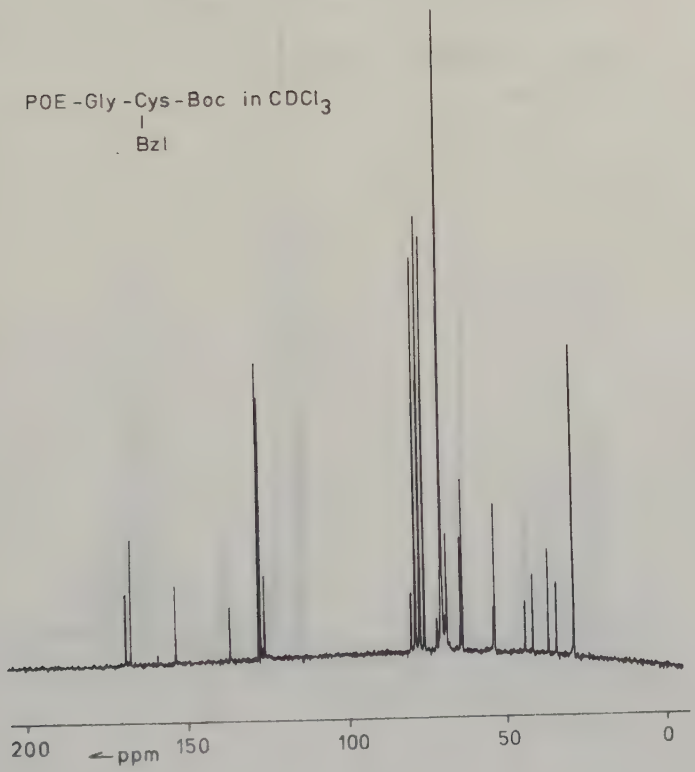
13 C=O	---	---	171.2	171.3	171.3
	171.8	172.1	172.3	172.6	
14 CH	---	---	59.8	59.6	59.4
	60.1	59.6	59.9	59.7	
15 CH	---	---	30.1	30.0	30.1
	29.9	30.3(LM)	30.8(LM)	31.2(LM)	
16 CH_3	---	---	18.7	19.0	19.1
	19.3	19.7	19.7	19.6	
17 CH_3	---	---	17.2	17.5	17.8
	18.2	18.6	18.6	18.5	

Leucin					
18 C=O	---	---	---	172.2	172.2
	172.2	172.5	172.8	172.9	
19 CH	---	---	---	52.6	52.9
	53.7	53.2$^{\oplus}$	53.3	53.2	
20 CH_2	---	---	---	41.0	41.2
	41.3	41.6	41.6	41.9$^{\oplus}$	
21. CH	---	---	---	24.3	24.7
	24.6°	25.0	25.1	25.0	
22 CH_3	---	---	---	22.8	22.9
	23.0	23.4	23.4	23.3	
23 CH_3	---	---	---	21.6	21.8
	21.7	22.0	22.0	21.7	
O-Benzyl-Tyrosin					
24 C=O	---	---	---	---	172.6
	173.0	173.4	173.2	173.3	
25 CH	---	---	---	---	56.2
	54.9	55.5	55.5	55.6	
26 CH_2	---	---	---	---	36.7
	35.6^{X}	36.8^{X}(LM)	36-3^{X}(LM)	36.9^{X}(LM)	
27 C_{arom}	---	---	---	---	128.1
	128.1	130.4	130.6	130.4	
28+32CH_{ort}	---	---	---	---	130.2
	130.1	131.5	131.2	131.0	
29+31CH_{met}	---	---	---	---	114.5
	115.4	115.2	115.2	115.1	
30 CH_{para}	---	---	---	---	157.9
	158.3	158.3	158.3	158.1	
33 CH_2	---	---	---	---	68.7
	68.7	70.3	70.2	70.2	

34 $C_{arom.}$	---	---	---	---	136.8
	136.8	138.3	138.3	138.1	
35+39CH_{ort}	---	---	---	---	127.3
	127.4	128.2	128.6	128.7	
36+38CH_{met}	---	---	---	---	128.5
	128.4	128.2	129.2	129.0	
37 CH_{para}	---	---	---	---	127.9
	127.6	128.5	129.2	128.6	
Leucin					
40 C=O	---	---	---	---	---
	173.7	173.8	173.4	173.9	
41 CH	---	---	---	---	---
	54.9	53.2$^{\oplus}$	53.3	53.5	
42 CH_2	---	---	---	---	---
	40.1	41.2	41.0	41.9	
43 CH	---	---	---	---	---
	24.8^{o}	25.0	25.1	25.0	
44 CH_3	---	---	---	---	---
	22.5	23.2	23.1	22.9	
45 CH_3	---	---	---	---	---
	21.2	21.8	21.6	21.5	
Alanin					
46 C=O	---	---	---	---	---
	---	174.7	174.1	174.1	
47 CH	---	---	---	---	---
	---	53.0$^{\oplus}$	53.3	53.2	
48 CH_3	---	---	---	---	---
	---	18.1	17.5	17.5	

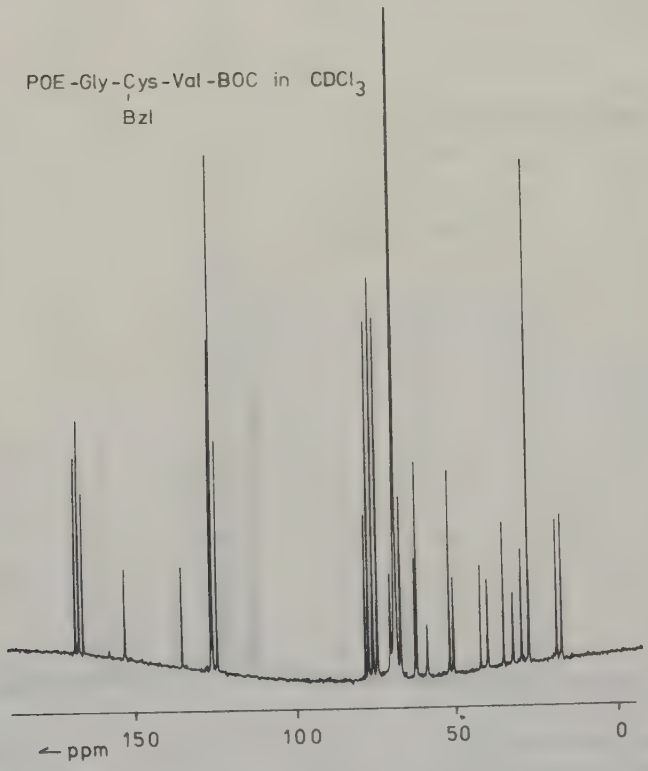
Glutaminsäure-γ-Benzylester					
49 C=O	---	---	---	---	---
	---	---	174.7	174.5	
50 CH	---	---	---	---	---
	---	---	56.2	56.3	
51 CH_2	---	---	---	---	---
	---	---	27.5	27.5	
52 CH_2	---	---	---	---	---
	---	---	34.5(LM)	35.0(LM)	
53 C=O	---	---	---	---	---
	---	---	172.2	172.6	
54 CH_2	---	---	---	---	---
	---	---	66.4	---	
55 C_{arom}	---	---	---	---	---
	---	---	137.2	---	
56+60CH_{ort}	---	---	---	---	---
	---	---	128.8	---	
57+59CH_{met}	---	---	---	---	---
	---	---	129.2	---	
58 CH_{para}	---	---	---	---	---
	---	---	128.3	---	
BOC-Gruppe					
61 C=O	155.1	154.9	155.5	155.0	155.9
	156.6	156.6	157.2	157.2	
62 C	78.6	79.9	79.4	79.0	80.7
81.2	79.4	79.8	79.8		
63 CH_3	27.7	28.0	27.7	27.7	28.1
	28.1	28.5	28.5	28.5	

Abb. 10: C-13 Spektrum in $CDCl_3$



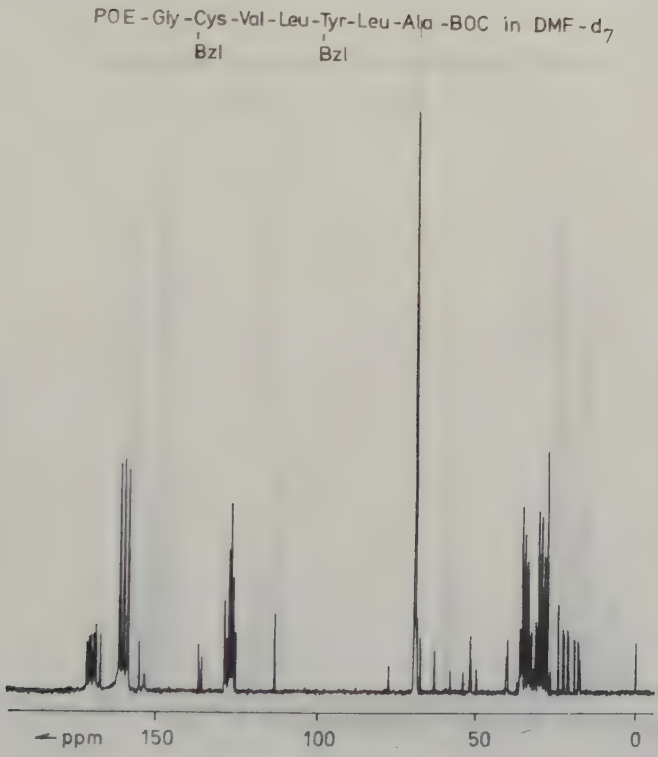
Die acht Resonanzen vom POE-Gly-BOC sind ohne weiteres auf Grund ihrer charakteristischen Lage eindeutig zugeordnet worden. So absorbiert die Carbonyl-Gruppe des Glycins bei 169.7 ppm, während die Carbonyl-Gruppe der BOC-Gruppe hochfeldverschoben bei 155.1 ppm liegt. Der

Abb. 11: C-13 Spektrum in $CDCl_3$



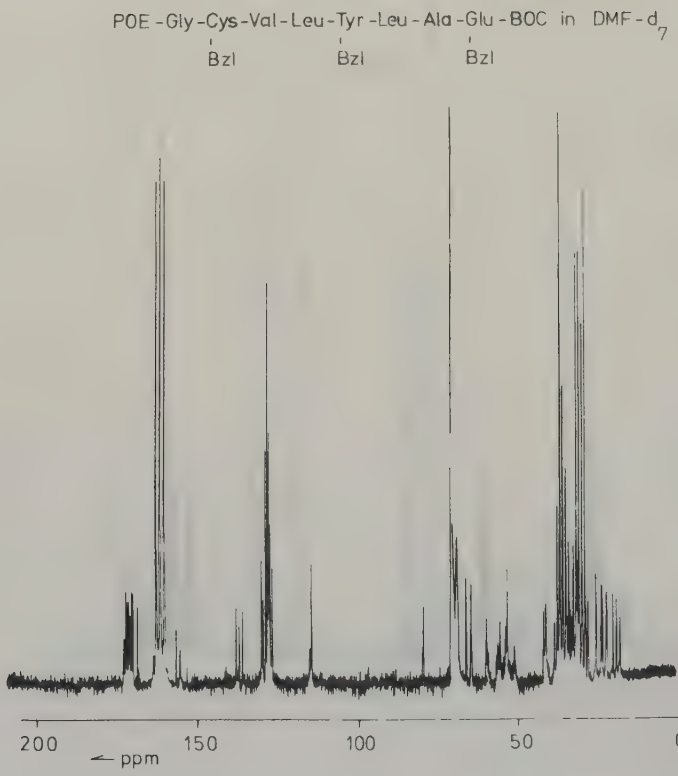
tertiäre Kohlenstoff der BOC-Gruppe erscheint deutlich bei 78,6 ppm, während die drei Methylgruppen sehr intensiv bei 27,7 ppm auftreten. Die Bindung an Polyethylenglycol (POE) kann in der Verschiebung von C_α abgelesen werden, das durch die Esterbindung bei 63,4 ppm absorbiert. C_β liegt bei 68,2 ppm und das Hauptsignal vom POE bei 69,8 ppm. Die CH_2-Gruppe von Glycin ist bei 41,7 ppm zu finden. Die Ver-

Abb. 12: C-13 Spektrum in DMF-d_7



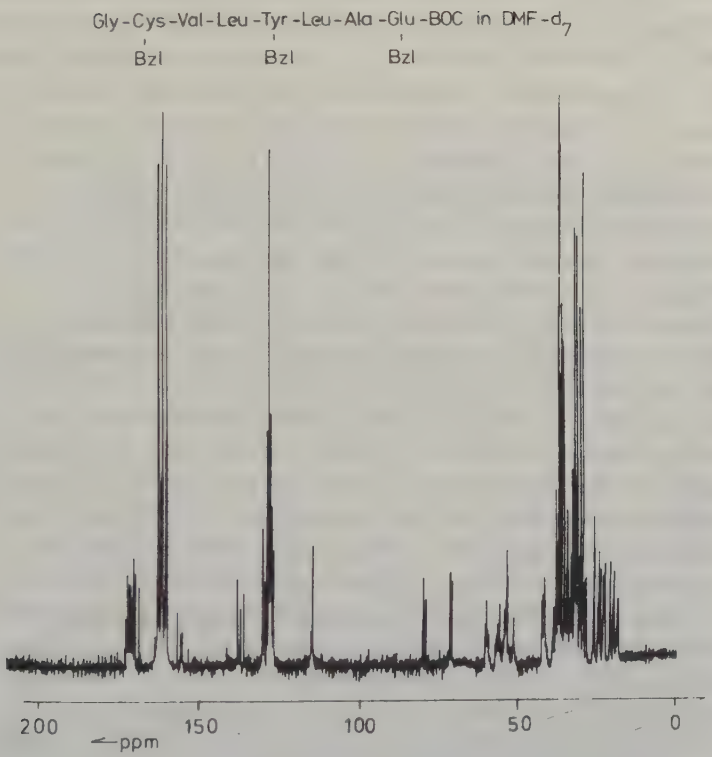
knüpfung von POE-Gly mit dem Schwefel geschützten Cystein ist am augenfälligsten ersichtlich am Auftreten von zwei charakteristischen Carbonyl-Resonanzen. Neben der Resonanz von Glycin bei 169,0 ppm tritt die Resonanz vom Cystein bei 170,6 ppm auf. Der tertiäre Kohlenstoff des Cysteins kommt tieffeldverschoben bei 53,4 ppm. Ebenso erscheint die Methylengruppe des Cysteins tieffeldverschoben bei 33,5 ppm

Abb. 13: C-13 Spektrum in DMF-d_7



gegenüber 41,0 ppm des Glycins. Dagegen erscheint die Methylengruppe der Benzylschutzgruppe bei 36,1 ppm (180). Die Zuordnung der aromatischen Resonanzen folgt aus dem gekoppelten Spektrum von BOC-Cys(Bzl). Aus den Kopplungsmustern kann zwischen den o- und p-Kohlenstoffatomen unterschieden werden: Neben der ^{1}J-Kopplung zeigt C-8 /

Abb. 14: C-13 Spektrum in DMF-d_7



C-12 durch ^{3}J-Kopplung mit H-12 und H-10 Triplettaufspaltung, während C-9 / C-11 durch ^{3}J-Kopplung mit H-11 nur zum Dublett aufspaltet. Durch die unterschiedliche Multiplizität folgt die Zuordnung von C-7 und C-9. So erscheint der quatäre Kohlenstoff bei 138 ppm, während die anderen aromatischen Kohlenstoffe zwischen 126-130 ppm ihre Resonanz haben.

Die Resonanzen der BOC-Gruppe liegen wieder bei 154,9 ppm (CO-Gruppe), bei 79,7 ppm absorbiert der quartäre Kohlenstoff und die drei Methylgruppen bei 28,0 ppm. So können nun alle neu gekuppelten Aminosäuren schrittweise eindeutig zugeordnet werden.

Es ist interessant festzustellen, daß im Laufe der Synthese die einzelnen Resonanzen der Kohlenstoffatome um höchstens 1 ppm schwanken. Weiter fällt auch auf, daß die neu hinzutretenden Carbonylresonanzen immer tieffeldverschoben auftreten und sich im Bereich von 170-175 ppm befinden. Dagegen absorbiert die Carbonylgruppe der BOC-Gruppe hochfeldverschoben bei 155-157 ppm. Die CH_2 Resonanzen werden im Bereich von 27-42 ppm beobachtet. Nur in Nachbarschaft eines Sauerstoffatoms erscheint sie bei 66 ppm. Die CH-Resonanzen kommen im Bereich von 43-60 ppm. Nur das CH-Signal der Isopropylgruppe bzw. Isobutylgruppe erscheint bei 30 ppm bzw. 25 ppm. Die Resonanz der Methylgruppe von Alanin absorbiert bei 18 ppm, während das Signal der BOC-Gruppe eine Tieffeldverschiebung nach 28 ppm erfährt. Die beiden Methylgruppen der Isopropyl- bzw. Isobutylgruppe erscheinen als Doppelresonanzen im Bereich von 17-20 ppm bzw. 21-24 ppm, ohne daß eine eindeutige Zuordnung möglich ist. Der quartäre Kohlenstoff der BOC-Gruppe erscheint bei 78-79 ppm. Eine Sonderstellung nehmen die C-Atome der Aromaten ein, wo die CH-Resonanzen der ortho- bzw. meta-Stellung in einem Ring die gleichen ppm-Werte besitzen (Symmetrie). Der quartäre Kohlenstoff absorbiert bei 137 ppm. Die CH-Resonanz in Parastellung erscheint bei 126-128 ppm. Nur beim Tyrosin liegt die Resonanz wegen der Wechselwirkung mit dem Sauerstoff tieffeldverschoben bei 157-158 ppm. Die CH-Resonanzen in ortho- bzw. meta-Stellung erscheinen im Bereich von 127-129 ppm, wobei die ortho-Stellung meist hochfeldverschoben ist. Wegen der Wechselwirkung mit dem Sauerstoff erscheint die CH-Resonanz der Meta-

stellung von Tyrosin hochfeldverschoben bei 115 ppm und die ortho-Stellung tieffeldverschoben bei 130-131 ppm. Das Fehlen des Kohlenstoffatoms C 54 beweist, daß die j-Benzylgruppe an der Glutaminsäure durch die alkalische Hydrolyse abgespalten wurde

V. Kinetik eines Polymerpeptides mit einem Aktivester unter gleichzeitiger Metallsalzkatalyse

V.1. Einleitung (184-185)

Die kinetische Geschwindigkeitsgleichung der Reaktion

$$A + B \longrightarrow C + D$$

lautet:

$$\frac{da}{dt} = - k \cdot a \cdot b$$

K = Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung
a, b = Konzentration der Stoffe A und B zur Zeit t

Für die Extinktionsänderung $\triangle$ En bei der Wellenlänge n zur Zeit t gilt das Lambert-Beer-Gesetz (186-187), wobei K mit Hilfe der Extinktionsdifferenzen bestimmt werden kann (188-189).
Es gilt:

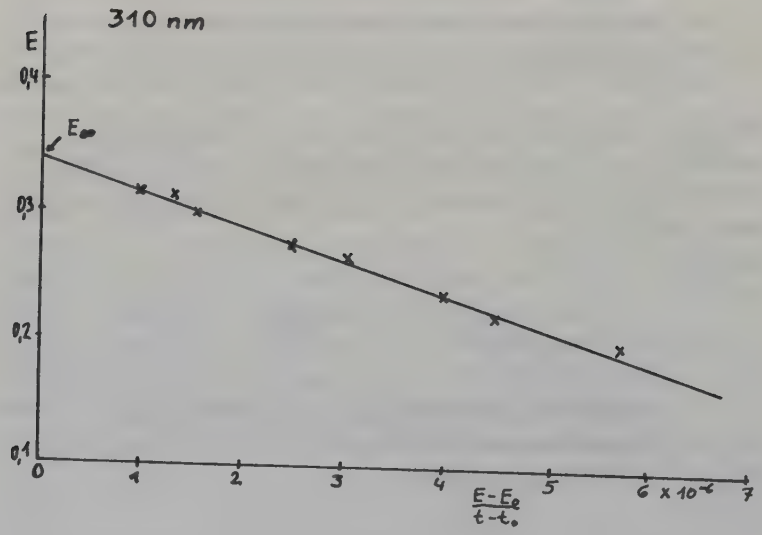
$$\frac{E1 - Eo1}{t - to} = K \; a \; E_{\infty} \; 1 - K \; a \; E1$$

a = Konzentration der Stoffe (hier 10^{-3} molar)
Eo1 = Extinktion zur Zeit t = o
E1 = Extinktion zur Zeit t

$E_{\infty}1$ = Extinktion am Ende der Reaktion, sie kann geometrisch aus dem $E / \frac{\Delta E}{\Delta t}$ -Diagramm als Schnittpunkt der Geraden mit der E-Achse bestimmt werden.
Die Geschwindigkeitskonstante K ergibt sich als Steigung im $E / \frac{\Delta E}{\Delta t}$ -Diagramm (190-191).

Die Abb. 15 zeigt die Reaktion von POE -Gly_3 mit BOC-Gly-ONP im $E / \frac{\Delta E}{\Delta t}$ - Diagramm, wo der Schnittpunkt mit der E-Achse die Extinktion am Ende der Reaktion ($E_{\infty}1$) ergibt. Die Steigung dieser Gerade ergibt die Geschwindigkeitskonstante K.

Abb. 15:



V.2. Reaktionskinetik von Aktivestern mit einer Aminokomponente

In den 50iger Jahren beginnen die kinetischen Arbeiten mit der Aminolyse von Carbonsäureestern mit Aminen. Dabei kann ein sterischer Effekt festgestellt werden, der die Geschwindigkeitskonstante dahin beeinflußt, daß mit zunehmender Verzweigung die Geschwindigkeitskonstante abnimmt. Der Übergang vom primären zum sekundären Amin zeigt zudem, daß mit abnehmender Basität auch die Aminolysegeschwindigkeit kleiner wird (192-193). Die gleichen Effekte beobachtet auch J. Polster (184) bei den Reaktionen von BOC-Gly-ONP mit Butylamin (primär) bzw. Diethylamin (sekundär), die sich ungefähr um den Faktor 100 unterscheiden. Die Literatur weist nun viele Messungen über den Kupplungsschritt von Aktivestern mit Aminosäurekomponenten auf (194-212), die aber zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen führen. Teilweise können zur Erklärung Lösungsmitteleffekte (194, 195, 199, 200, 205), Temperatur- (198, 206, 208), Basen- (197) und sterische Effekte (196, 204) angeführt werden.

Auch die Vielfalt der Messungen beim Kupplungsschritt von Aktivestern bzw. Anhydriden mit den Merrifield gebundenen Peptiden bzw. Aminosäuren zeigt keine einheitliche Linie (213-226). Auch hier können zur Erklärung Lösungsmitteleinflüsse (214), sterische Effekte der zu kuppelnden Aminosäurederivate (217, 222, 223) , Einflüsse des vernetzten Merrifield-Harzes (224-226) herangezogen werden. Auch die Unterschiede zwischen der klassischen Methode einerseits und Merrifield-Methode differieren erheblich (215, 216, 218, 219, 220). So finden Maher et al. (227), daß die trägerfreie Aktivesterkupplung (Z-Leu-ONP + GlyOEt) ca. 100 mal schneller verläuft, als die am quervernetzten Träger (2 % Divinylbenzol). Bei Verwendung eines festen, linearen Polystyrolträgers reduziert sich

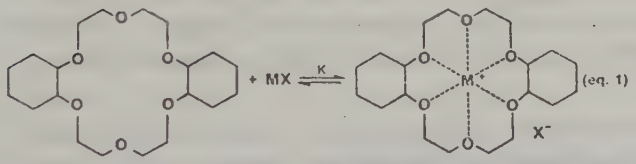
dieser Faktor auf ca. 3. A. Losse (226) kommt auf Grund von Diffusionsstudien an quervernetzten Polystyrolen zum Schluß, daß im Merrifield-Harz die Diffusion der Reagentien ohne wesentlichen Einfluß auf die Umsatzgeschwindigkeit ist. Danach soll diese in erster Linie durch sterische Faktoren am Reaktionszentrum begrenzt sein.

R.H. Andreatta (41) findet bei der Reaktion von Z-Ala-ONP mit dem niedermolekularen Prolinbenzylester (Pro-O-CH_2-C_6H_5), bei der Reaktion von Z-Ala-ONP mit dem hochmolekularen linearen Prolinpolystyrolester (Pro-O-CH_2-Polystyrol), und bei der Reaktion von Z-Ala-ONP mit dem hochmolekularen Prolinpolystyrolester (Pro-O-CH_2-2 % Divinylbenzol vernetztes Polystyrol) ein Verhältnis der Reaktionsgeschwindigkeiten von 3:2:1. Die relativ höhere Reaktionsgeschwindigkeitskonstante des linearen Polystyrols deutet auf eine katalytische Wirkung des polymeren Trägers hin. Eine katalytische Wirkung des polymeren Trägers wird auch in der Liquid-Phase-Peptid-Synthese beobachtet (96, 185, 190, 191). Dort reagiert durch tautomere Katalyse das POE-Triglycin mit BOC-GlyONP ungefähr um den Faktor 3 mal schneller, als die Reaktion von POE-Glycin mit BOC-GlyONP. Eine weitere Steigerung der Geschwindigkeitskonstante könnte nun durch Metallsalzkatalyse und Aktivierung der Estergruppe (BOC-GlyONP) erwartet werden. So könnte man postulieren, daß beim Zufügen eines Metallsalzes mittels Kronenethersalzkomplexbildung, die Kupplungsgeschwindigkeit weiter zu steigern sei. Die Überprüfung dieser Annahme ist die Aufgabe dieser Arbeit.

V.3. Polyethylenglycol (POE) als Kronenether

Die Chemie der Kronenether nimmt in neuerer Zeit einen immer größer werdenden Raum ein. Es werden in der Literatur eine Vielzahl cyclischer und nicht cyclischer Kronenether beschrieben (228-237). Auch die Komplexierung mit den verschiedenen Metallsalzen wird ausführlich behandelt. Man findet 1:1 und 2:1 (Metallsalz:Kronenether) Komplexe, sowohl für die cyclischen wie nichtcyclischen Kronenether.

Abb. 16: Komplexierung des Metallsalzes



Auf dieser komplexierenden Eigenschaft für Metallsalze beruht auch die Anwendung der Kronenether als Ionenaustauscher bzw. zur Extraktion von Metallkationen (238, 239). Auch in der Peptidchemie läßt sich die Dichlorbenzyloxycarbonyl(DCZ)-Gruppe als Schutzgruppe für das empfindliche Tryptophan leicht einführen (240). Auch bei der Merrifield-Peptid-Synthese kann bei der Veresterung des chlormethylierten Polystyrols mit dem Salz der C-terminalen Aminosäure der Einsatz von Kronenether sinnvoll sein. Das Kaliumsalz hat sich in Verbindung mit 18 crown 6 als besonders wirkungsvoll erwiesen (241). Ebenso wird eine selektive Abspaltung von Peptiden am Oxy-acyl-Resin durch Kronenethersalz leichter, wobei Drittfunktionen von Aminosäuren nicht angegriffen werden. Es wird die starke nucleophile Kraft des Komplexes, speziell des Anions (Cyanid oder Fluorid) ausgenützt (242, 243).

Es liegt nun auf der Hand, Kronenetherkomplexe mit Polyethylenglycolderivaten herzustellen. In cyclischer Form gelingt die Darstellung mit maximal neun POE-Einheiten als Dibenzo-Krone (244). Offenkettige Oligoethylenglycolkomplexe werden erst in letzter Zeit beschrieben (245). Es werden auch hier 1:1 bzw. 2:1 (Metallsalz : POE-Derivat) Komplexe erhalten.

Die Komplexierung des unsubstituierten Polyethylenglycols mit verschiedenen Metallsalzen zeigt die gleichen Verhältnisse. Bereits in den 60iger Jahren werden Harnstoff- (246-248), Quecksilber(II)-chlorid- (246, 249-252) und Alkalikomplexe (253, 254) ausführlich beschrieben. So findet R.D. Lundberg (254) daß die optimale Salzkonzentration bei $5 \cdot 10^{-2}$ M liegt. Er findet weiter, daß eine 2 %ige POE-Lösung in Methanol optimale Komplexbildung ergab.

NMR-Untersuchungen bestätigen diese Aussagen (255, 256). Kürzlich berichtet eine japanische Gruppe von der Anwendung des Polyethylenglycols als Kronenetherkomplex. Als Beispiel dient die Oxydation von Stilben mit Kaliumpermanganat in unpolaren Lösungsmitteln (Benzol, Toluol etc.). Kinetische Untersuchungen zeigen, daß der Ablauf der Reaktion mit der normalen Kronenetherkomplex-Katalyse vergleichbar ist (257). Es werden nun einige Versuche unternommen Metallsalzkomplexe von Polyethylenglycol darzustellen. Als Lösungsmittel dient Acetonitril, welches dann auch bei den kinetischen Messungen verwendet wird. Die Konzentration wird auf 10^{-3} Mol angesetzt, wobei die Metallsalzkonzentration doppelt so groß sein muß, da das Polyethylenglycol bifunktionell ist. Darin ist die Annahme enthalten, daß sich der Kronenether überwiegend am Ende des Polymers bildet.

Die Tabelle 4 gibt den Grad der Komplexierung der Metallsalze mit dem Polyethylenglycol (MG = 20.000) in Acetonitril wieder. Dabei bedeutet X = 1.00, daß eine totale Komplexierung (100 % des eingesetzten Salzes werden gebunden) des Metallsalzes. Für X = 0.1 gilt analog, daß nur 10 % des eingesetzten Salzes gebunden werden. Die Konzentration des Polyethylenglycols und der Salze werden den Bedingungen der nachfolgenden kinetischen Messungen angepaßt. Somit ist die Konzentration an POE 10^{-3} molar und die der Metallsalze $2 \cdot 10^{-3}$ molar, wobei die Konzentrationen auf eine Hydroxylgruppe vom Polyethylenglycol bezogen wird.

Tabelle 4: Komplexierung des Metallsalzes mit POE in Acetonitril

	KCl	KBr	$CsCO_3$	CsCl	$MgCl_2x6H_2O$	$CaCl_2x2H_2O$	KF	KJ
x	0.75	0.80	0.40	1.00	0.40	1.00	0.60	1.00

	$BaCl_2x2H_2O$	$BaAc_2$	$CdCl_2x2H_2O$	$ZnCl_2$	$ZnSO_4$	$HgCl_2$
x	0.30	0.10	0.30	1.00	0.10	1.00

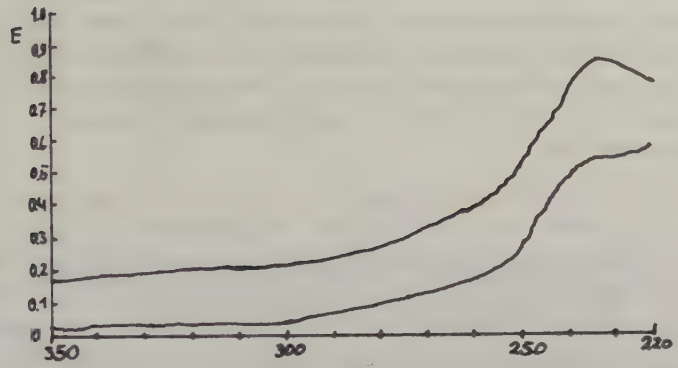
Es zeigt sich nach diesen Vorversuchen, daß nur wenige Salze gut für Kronenetherkomplexbildung geeignet sind. Es sind dies vor allem Cäsiumchlorid und Calciumchlorid. Es kann zudem eindeutig ein Anioneneffekt nachgewiesen werden, wie die Beispiele Cäsiumchlorid und Cäsiumcarbonat einerseits, und Zinkchlorid und Zinksulfat andererseits eindeutig beweisen. "Harte" Anionen (Carbonat und Sulfat) gehen kaum in Lösung, weil sie durch das Acetonitril kaum

solvativiert werden (253, 254). Dagegen nimmt die Komplexierung vom Fluorid zum Jodid deutlich zu, da die Polarisierbarkeit der Anionen in dieser Reihenfolge ansteigt. Andererseits tritt auch ein Kationeneffekt in der Art auf, daß große Kationen, wie Calcium und Cäsium total komplexiert werden. Es ist denkbar, da die beiden Ionen etwa gleiche Ionenradien besitzen (Schrägbeziehung), daß sie besonders gut in die Konformation des Polyethylenglycols passen. Bekräftigt wird diese Annahme dadurch, daß das Bariumchlorid, welches eigentlich ein besserer Komplexbildner wäre, kaum Tendenzen dazu zeigt.

Der polymere Einfluß bei der Komplexierung ergibt, daß bei gleicher eingesetzter Menge an Polyethylenglycol (je 1 g der Molekulargewichte 3.000, 6.000, 10.000, 20.000) eine Abnahme der Komplexbildung zu höheren Molekulargewichten hin stattfindet. Es bestätigt aber die Annahme, die Hydroxylgruppe einen Einfluß auf die Komplexierung hat und steht in gutem Einvernehmen mit den Arbeiten von R.D. Lundberg (254). Qualitativ kann die Komplexierung mit der UV-Spektroskopie verfolgt werden, wo die Komplexe stärker absorbieren.

Die Abbildung 17 zeigt das UV-Spektrum einer 0,75 x 10^{-3} molaren POE-Lösung in Acetonitril (untere Linie). Das Maximum befindet sich bei 233 nm. Bei Zugabe von 1.5×10^{-3} Mol $CaCl_2 \times 6H_2O$ zu dieser Lösung verdopplet sich die Extinktion bei 233 nm.

Abb. 17: UV-Spektrum von POE und POE-Komplex



Quantitativ wird die Komplexierung mittels der Gravimetrie verfolgt.

V.4. Kinetische Untersuchungen

Die Untersuchungen werden mit Hilfe der UV-Spektroskopie bei verschiedenen Wellenlängen (320 nm, 310 nm, 270 nm, 265 nm, 260 nm) verfolgt. Folgende Reaktion wirkt kinetisch verfolgt

$$\text{POE-Gly-Gly-Gly}\cdot\text{HCl} + \text{BOC-GlyONP} + \text{TÄA} + M^+A^- \longrightarrow$$

$$\text{POE-Gly-Gly-Gly-Gly-BOC} + \text{p-Nitrophenol} + M^+A^- + \text{TÄA.HCl}$$

Die Wellenlängen 270-260 nm zeigen die Abnahme des BOC-GlyONP-Aktivesters während der Reaktion an. Die Wellenlängen 320 und 310 nm zeigen die Entstehung des p-Nitrophenols an. Beide müssen die gleiche Geschwindigkeitskonstante K liefern.

Die entstehenden Produkte dürfen auch nicht mit den Ausgangsprodukten reagieren, was sonst zu einer Verfälschung der Ergebnisse führt. Mehrere durchgeführte Messungen bestätigen diese Voraussetzung. Der Versuch, mit Hilfe einer berechneten Menge Base (Triethylamin) das Polymerpeptid vorher zu entprotonisieren, führt zu unangenehmen Nebenreaktionen, so daß kein Umsatz (p-Nitrophenol) festgestellt werden kann.

V.4.1. Die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit bei Variation der Reaktionsbedingungen

Bevor die metallsalzkatalysierten Reaktionen kinetisch verfolgt werden, ist es interessant die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit bei Variation der Reaktionsbedingungen zu bestimmen. Dazu setzt man das POE-Gly-Gly-Gly·HCl mit BOC-GlyONP und Triethylamin nach obiger Gleichung (vgl. V.4. ohne Metallsalz) um. Die Variation der Reaktionsbedingungen wird nun folgendermaßen durchgeführt. Es werden die Konzentrationen von zwei Reaktionspartnern bei der Umsetzung konstant gehalten (10^{-3} molar). Durch Variation der Konzentration des dritten Reaktionspartners wird die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Konzentration bestimmt.

a) Zunächst einmal werden in der zu vermessenden Reaktion an Stelle des Triethylamins noch andere Basen getestet (N-Methylmorpholin (NMM), P yridin (Pyr) und Triton B). Die Tabelle 5 liefert die Ergebnisse der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten K bei Variation der Basen.

Tabelle 5: Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstante K bei verschiedenen Basen

Base	NMM	Triton-B	TÄA	Pyr
$10^{-1} \cdot K$	0.18	0.20	0.18	0.05

b) Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten K von der Konzentration der Base: Bei der Reaktion von POE-Gly-Gly-Gly·HCl mit BOC-GlyONP und Triethylamin wird zunächst die Konzentration der Base variiert. Die beiden anderen Partner werden in einer Konzentration von 10^{-3} M eingesetzt. Die Tabelle 3 zeigt die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten K von der Konzentration der Base. Dabei wird die Basenkonzentration von 10^{-3} M auf 10^{-2} M gesteigert.

Tabelle 6: K in Abhängigkeit von der Basenkonzentration

Konz · 10^{-3} M	1	2	5	10
K · 10^{-1}	0.18	0.2	0.24	0.22

Das leichte Ansteigen der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten K bei Zunahme der Basenkonzentration kann auf zweierlei Art und Weise erklärt werden. Erstens ist es möglich, daß bei der Basenkonzentration von 10^{-3} M die Deprotonierung der Aminokomponente nicht vollständig erfolgt. Zweitens ist ein katalytischer Effekt möglich, analog der Veresterung von POE mit BOC-Aminosäuren, wo das Pyridin die Katalyse ausführt.

c) Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten K von der Konzentration des BOC-GlyONP. Nun wird bei der Reaktion von POE-Gly-Gly-Gly·HCl mit BOC-GlyONP und Triethylamin die Konzentration des Aktivesters variiert. Die Konzentration der beiden Reaktionspartner beträgt 10^{-3} M. Die Tabelle 7 zeigt die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten von der Konzentration des Aktivesters. Die Konzentration von BOC-GlyONP variiert zwischen 0,5-$2 \cdot 10^{-2}$ Mol.

Tabelle 7: K in Abhängigkeit der Konzentration von BOC-GlyONP

Konz · 10^{-3} M	0.5	1	1.5	2
K · 10^{-1}	0.15	0.18	0.21	0.24

Der Tabelle 7 können folgende Aussagen entnommen werden. Zunächst einmal ist es nicht überraschend, daß bei der Zunahme der Konzentration von BOC-GlyONP, die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante leicht ansteigt ($0.15\text{-}0.24 \cdot 10^{-1}$). Andererseits ist dieser Effekt nicht gravierend, wie die BOC-GlyONP-Konzentration von 10^{-3} Mol mit $K = 0.18 \cdot 10^{-1}$ gegenüber von $5 \cdot 10^{-4}$ Mol mit $K = 0.15 \cdot 10^{-1}$ zeigt. Beide Werte befinden sich noch innerhalb der Fehlergrenze.

d) Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten K von der Konzentration des POE-Gly-Gly-Gly·HCl:
Als letztes wird bei der Reaktion von POE-Gly-Gly-Gly·HCl mit BOC-GlyONP und Triethylamin die Konzentration der Aminkomponente variiert ($0.5\text{-}2 \cdot 10^{-3}$ M). Die Konzentration der beiden anderen Reaktionspartner bleibt bei 10^{-3} Mol. Die Tabelle 8 liefert die Ergebnisse der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten K in Abhängigkeit von der Konzentration des POE-Gly-Gly-Gly·HCl.

Tabelle 8: K in Abhängigkeit der Konzentration vom POE-Gly-Gly-Gly·HCl

Konz · 10^{-3} M	0.5	1	1.5	2
K · 10^{-1}	0.08	0.18	0.21	0.3

Die Ergebnisse weisen deutlich einen polymeren Einfluß auf die Reaktionsgeschwindigkeit nach. So findet man bei einer $0.5 \cdot 10^{-3}$ molaren Konzentration an Polymerpeptid einen K-Wert von $0.08 \cdot 10^{-1}$. Verdoppelt man nun die Konzentration des Polymerpeptides (10^{-3} M bzw. $2 \cdot 10^{-3}$ M), so verdoppelt sich auch die Reaktionsgeschwindigkeit ($0.18 \cdot 10^{-1}$ bzw. $0.3 \cdot 10^{-1}$).

Die Ergebnisse zeigen, daß alle tertiären Amine, bis auf das Pyridin, als Base eingesetzt werden können. Beim Pyridin reicht die Basizität nicht aus, um die Deprotonierung der Aminogruppe am Peptid zu vollziehen.

V.4.2. Kinetik von BOC-GlyONP mit Gly_3-POE und Metallsalzkatalyse

Zunächst wird bei den vielen durchgeführten Messungen festgestellt, daß die Absolutwerte der einzelnen Geschwindigkeitskonstanten von Polymerpeptid zu Polymerpeptid stark schwanken, aber die Verhältnisse gleich bleiben. Es ist auffallend, daß bei einer Beladung von 80 % ein Maximum auftritt, während bei vollständiger Veresterung dieser Wert durchgehend tiefer liegt.

In der Tabelle 9 wird die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante K von eine r 80 %igen Peptidbeladung am Polyethylenglycol durch Umsatz mit BOC-GlyONP bestimmt. Danach werden analoge Reaktionen unter Zusatz von äquimolaren Mengen

(10^{-3} M) an Metallsalzen vermessen und K bestimmt. Diese Geschwindigkeitskonstanten K werden dann mit den Ergebnissen in Relation gebracht, die eine 100 %ige Peptidbeladung am Polyethylenglycol voraussetzen.

Tabelle 9: Bestimmung von K für die Reaktion von BOC-GlyONP mit POE-Gly_3 und gleichzeitiger Metallsalzkatalyse, wobei die Peptidbeladung am Polymer variiert

	ohne Salz	$CaCl_2 x 6H_2O$	CsCl	$HgCl_2$	$ZnCl_2$
80 % Beladung	0.33	0.29	0.57	0.11	0.07
100 % Beladung	0.11	0.13	0.26	0.04	0.03

Zunächst fällt einmal auf, daß die Peptidbeladung am Polyethylenglycol einen Einfluß auf die Reaktionsgeschwindigkeit hat. So reagiert das Polymerpeptid mit der 80 %igen Beladung am POE rund 2-3 mal schneller als das Polymerpeptid mit der 100 %igen Beladung. Dabei spielt die Anwesenheit vom Metallsalz keine Rolle. Auch die Verhältnisse der einzelnen Reaktionsgeschwindigkeiten innerhalb einer Meßreihe stimmen gut überein.

Tabelle 9 zeigt zudem, daß die Übergangsmetallsalze wie Quecksilberchlorid und Zinkchlorid zwar gute Komplexbildner sind, aber die Reaktion eher hemmen . Das Cäsiumchlorid aktiviert deutlich, während das Caciumchlorid keine katalytischen Effekte zeigt. Es werden aus diesem Grunde zunächst einmal die Alkalisalze durchgemessen und die erhaltenen Werte gemittelt. Alle Reaktanten werden in einer Konzentration von 10^{-3} eingesetzt.

Die Tabelle 10 liefert die Ergebnisse der Geschwindigkeitskonstanten K für die Reaktion von BOC-GlyONP mit POE-Triglycin und gleichzeitiger Alkalimetallsalzkatalyse bei einer 10^{-3} molaren Konzentration aller Reaktanten.

Tabelle 10: K von der Reaktion BOC-GlyONP + Gly_3P_{20} + M^+A^-

ohne Salz	LiCl		
0.18	0.29		
NaF	NaCl	NaBr	NaJ
0.19	0.21	0.23	0.24
KF	KCl	KBr	KJ
0.47	0.25	0.26	0.27
RbF	RbCl	RbBr	RbJ
0.50	0.29	0.30	0.31
CsF	CsCl	CsBr	CsJ
0.57	0.36	0.40	0.42

Tabelle 10 zeigt deutlich, daß alle Alkalisalze eine mehr oder weniger starke Beschleunigung der Reaktion von BOC-GlyONP mit Gly_3POE erwirken. Man sieht einen Kationeneffekt darin, daß mit zunehmendem Ionenradius (Na^+ —— Cs^+) auch die Geschwindigkeitskonstante deutlich ansteigt (0.19 —— $0.57 \cdot 10^{-1}$ für die Alkalifluoride). Das Ergebnis bestätigt deutlich auch die Tendenz der Komplexierung wo eine Zunahme vom Natriumsalz zum Cäsiumsalz festzustellen ist. Aber auch ein Anioneneffekt ist deutlich sichtbar. Vom Chlorid zum Jodid in jedem Alkalimetallsalz ist ein Anstieg der Reaktionsgeschwindigkeit festzustellen. Das kann sehr

leicht mit der zunehmenden Polarisierbarkeit des Anions erklärt werden. Die Ausnahme bilden die Fluoride, welche die Reaktion am besten katalysieren. Auffallend ist zudem, daß die Reaktionsläsung sich gelb färbt, was auf entstandenes p-Nitrophenolat-Anion hinweist. Eine Messung bei der Wellenlänge 410 nm zeigt das erwartete Maximum für das p-Nitrophenolat-Anion deutlich an. Betrachtet man POE als Kronenether, so ist es gar nicht allzu überraschend, da die Kronenetherkomplex-Anionen eine hohe nucleophile Kraft besitzen (236). Im Falle des Fluoridanions reicht die nucleophile Kraft aus, um sich das Proton des p-Nitrophenols zu holen. Dieser Effekt tritt bei größeren Salzkonzentrationen noch mehr in den Vordergrund.

Bei den Alkalijodiden kann die Umsetzung nur bei der Wellenlänge 310 nm (entstehendes p-Nitrophenol) verfolgt werden, da bei 270 nm ein Maximum auftritt. Dieses Maximum deutet auf einen POE-Jod-Komplex hin, da bei den Jodiden immer etwas Jod zu finden ist.

V.4.3. Variation der Metallsalzkonzentration

Die vorangehende Messung zeigt deutlich, daß die Alkalifluoride am besten geeignet sind die Reaktion BOC-GlyONP mit Gly_3P_{20} zu katalysieren. Es ist nun interessant, Konzentrationseffekte der Metallsalze zu studieren. Die nachstehende Untersuchung soll zudem klären, ob Wasser irgendwelche katalytische Wirkung auf die Reaktion hat. Die Tabelle 11 zeigt die Ergebnisse für die Geschwindigkeitskonstante K der Reaktion von BOC-GlyONP, Gly_3P_{20} und variierter Kaliumfluorid Metallsalzkonzentration ($3 \cdot 10^{-4}$M-10^{-2}M) an. Eine analoge Reaktion unter 10^{-3}M Wasserzusatz wird angegeben. Die Konzentration von BOC-GlyONP und Gly_3P_{20} ist 10^{-3}M.

Tabelle 11: Variation der Kaliumfluoridkonzentration mit und ohne 10^{-3} M Wasserzusatz

Konz.	$K_{ohne\ H_2O} \cdot 10^{-1}$	$K_{mit\ H_2O} \cdot 10^{-1}$
$3 \cdot 10^{-4}$ M	0.24	0.24
$5 \cdot 10^{-4}$ M	0.30	0.29
$7 \cdot 10^{-4}$ M	0.36	0.35
10^{-3} M	0.47	0.46
$2 \cdot 10^{-3}$ M	0.98	0.99
$4 \cdot 10^{-3}$ M	0.47	0.48
$8 \cdot 10^{-3}$ M	0.42	0.43
10^{-2} M	0.36	0.37

Zunächst zeigt die Meßreihe eindeutig, daß ein katalytischer Einfluß des Wassers auf die Reaktion BOC-GlyONP + Gly_3POE mit gleichzeitiger Metallsalz-Katalyse auszuschliessen ist. Andererseits ist ein Maximum der Reaktionsgeschwindigkeit bei der doppelten Konzentration aufgetreten, was einem 2:1 Komplex (Metallsalz:POE) entspricht, welches dem Erwarteten entspricht. Einschränkend muß allerdings gesagt werden, daß die Reaktionen mit höherer Salzkonzentration nicht mehr eindeutig linear verlaufen, so daß eine Auswertung schwierig wird. Die Bildung des Phenolatanions ist aber mit zunehmender Salzkonzentration immer ausgeprägter, so daß anzunehmen ist, daß die Komplexbildung von Gly_3POE mit den Metallsalzen der geschwindigkeitsbestimmende Schritt wird. Dies ist umso wahrscheinlicher, da zunächst der Kronenetherkomplex von Gly_3POE mit den Metallsalzen gebildet wird, bevor die eigentliche Um-

setzung stattfindet. Anhand der Katalyse mit Rubidiumfluorid (RbF) bzw. Cäsiumfluorid (CsF) wird eine weitere Überprüfung der Konzentrationseffekte durchgeführt. Die Tabelle 12 zeigt die Ergebnisse der Geschwindigkeitskonstanten K für die Reaktion von BOC-GlyONP mit dem POE-Triglycin und einer variierten Konzentration der Metallsalzzugabe (RbF, CsF). Die Konzentration von BOC-GlyONP und POE-Triglycin ist 10^{-3} molar.

Tabelle 12 : K von BOC-GlyONP + Gly_3P_{20} + RbF (CsF)

Konz.	$K_{RbF} \cdot 10^{-1}$	$K_{CsF} \cdot 10^{-1}$
$5 \cdot 10^{-4}$ M	0.42	0.50
10^{-3} M	0.50	0.57
$2 \cdot 10^{-3}$ M	1.00	1.14
$4 \cdot 10^{-3}$ M	0.50	0.59
$6 \cdot 10^{-3}$ M	0.40	0.50

Die Ergebnisse zeigen deutlich die gleichen Effekte, wie bei der Katalyse mit Kaliumfluorid. Auch bei der Katalyse der obigen Reaktion mit RbF bzw. CsF findet man ein Maximum für die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante K bei einer $2 \cdot 10^{-3}$ molaren Metallsalzkonzentration. Das entspricht einem 2:1 Komplex (Metallsalz/POE). Die K-Werte steigen aber auch vom KF ($0.98 \cdot 10^{-1}$) zum CsF ($1.14 \cdot 10^{-1}$), was auf die bessere Komplexierung des Cäsium-Kations an das POE-Peptid schließen läßt.

V.4.4. Einfluß des Polyethylenglycols

Bereits im Kapitel V.4.2. haben wir einen Effekt des Polyethylenglycols (POE) festgestellt. Dort zeigt eine 80 %ige

Beladung des POE an Peptid eine 2-3 mal größere Reaktionsfreudigkeit gegenüber der 100 %igen Beladung. Nun ist es interessant einen Vergleich mit der analogen niedermolekularen Reaktion zu machen. Dazu setzt man das BOC-GlyONP mit dem Triglycinethylester um und vergleicht mit der Umsetzung von BOC-GlyONP mit dem POE-Triglycin. Danach werden beide Reaktionen mit den Alkalifluoriden katalysiert. Die Konzentration aller Reaktionspartner ist 10^{-3} molar.

Die Tabelle 13 liefert die Ergebnisse der Geschwindigkeitskonstanten K für die Reaktionen von BOC-GlyONP mit Gly_3OEt einerseits und BOC-GlyONP mit Gly_3-POE andererseits. Beide Reaktionen werden dann mit den Alkalifluoriden katalysiert und K bestimmt.

Tabelle 13: K von der Reaktion Gly_3OEt bzw. Gly_3POE + BOC-GlyONP $\pm$ M^+A^-

Peptid	$K_o \cdot 10^{-1}$	$K_{KF} \cdot 10^{-1}$	$K_{RbF} \cdot 10^{-1}$	$K_{CsF} \cdot 10^{-1}$
Gly_3OEt	0.13	0.20	0.22	0.25
$POEGly_3$	0.18	0.47	0.50	0.57

Bereits der Vergleich des makromolekulen (POE)- mit dem niedermolekulargebundenen Peptid zeigt auch ohne Metallsalzkatalyse deutlich einen Unterschied in der Reaktivität. So reagiert das Polyethylenglycol-Peptid um rund 50 % (0.18 —— 0.13) schneller als der Ethylester des Triglycins. Erstaunlicherweise wird auch die niedermolekulare Reaktion metallkatalysiert, obwohl kaum Komplexierungstendenzen für die Metallkatalyse zu beobachten sind.

Wahrscheinlich reichen bereits katalytische Mengen aus. So verdoppelt sich die Reaktionsgeschwindigkeit beim Einsatz des Cäsiumfluorids als Katalysator gegenüber der unkatalysierten Reaktions. Vergleicht man aber mit den polymergebundenen Peptiden, so stellt man fest,daß diese noch um den Faktor 2 schneller reagieren.

V.4.5 Erdalkalimetallsalzkatalyse

Da das $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ ein guter Komplexbildner ist , erscheint es sinnvoll, auch alle Erdalkalimetallsalze auf katalytische Effekte bei der Reaktion von BOC-GlyONP mit Gly_3POE und den Metallsalzen zu untersuchen. Es wird in einer 10^{-3} molaren Konzentration gemessen.

In Tabelle 14 befinden sich die Ergebnisse der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten K für die Reaktion von POE-Triglycin mit dem BOC-GlyONP und gleichzeitiger Erdalkalisalzkatalyse

Tabelle 14: K von BOC-GlyONP + Gly_3POE + $M^{2+}X_2^-$

	MgF_2	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	$MgBr_2 \cdot 6H_2O$	$MgJ_2 \cdot 6H_2O$
$K \cdot 10^{-1}$	0.24	--	--	--
	CaF_2	$CaCl_2 \cdot 6H_2O$	$CaBr_2 \cdot 4H_2O$	$CaJ_2 \cdot 4H_2O$
$K \cdot 10^{-1}$	0.27	0.19	0.19	0.19
	SrF_2	$SrCl_2 \cdot 6H_2O$	$SrBr_2 \cdot 4H_2O$	
$K \cdot 10^{-1}$	0.27	0.20	0.23	

Es werden die Ergebnisse der Voruntersuchung bestätigt. So zeigen die Chloride, Bromide und Jodide des Cäsiums bzw. Strontiums weder aktivierende noch desaktivierende Tendenzen. Somit erübrigt sich auch das Durchmessen der Bariumsalze. Interessant ist, daß die Halogenide des Magnesiums (außer Fluorid) so stark komplexieren, so daß keine Reaktion mehr stattfindet. Da es in der Naturstoffchemie einige stabile Magnesiumkomplexe gibt, überrascht auch dieser Befund nicht. Lediglich die Fluoride katalysieren die Reaktion schwach (etwa 50 %), aber im Vergleich mit den Alkalifluoriden doch erheblich weniger.

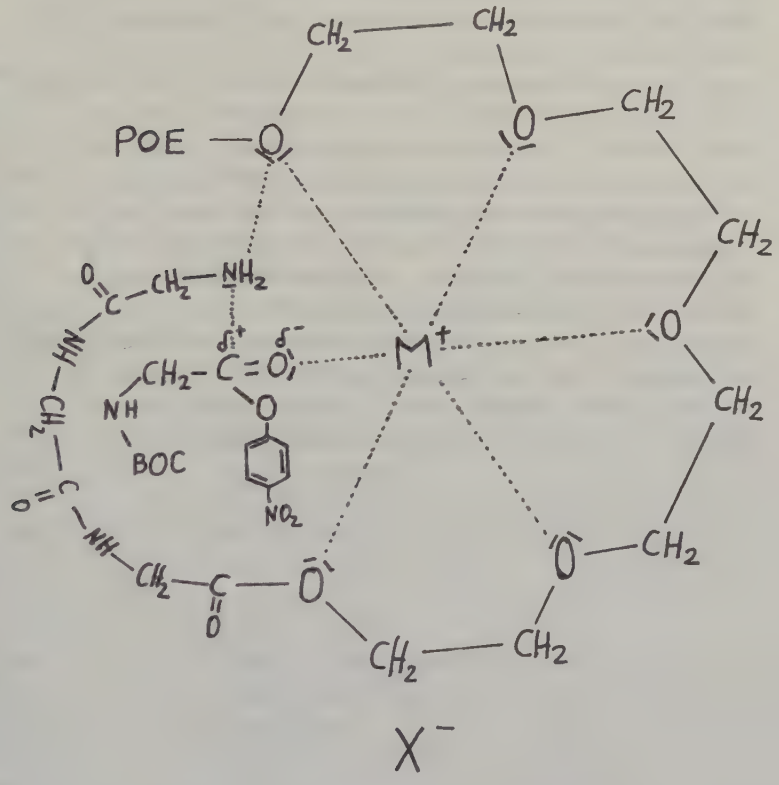
V.5. Zusammenfassung der Kinetik

Die Reaktion von BOC-GlyONP mit Gly_3POE wird mit der UV-Spektroskopie quantitativ untersucht. Das Ende der Reaktion wird auf 80 % der Theorie Umsatz (etwa 40 Stunden) festgelegt, da danach kaum noch Linearität besteht. Dabei wird die Metallsalzkatalyse so durchgeführt, daß die Komplexierung des Salzes mit dem Polymerpeptid der eigentlichen Reaktion vorangeht und die nachfolgende Reaksomit nach 2. Ordnung behandelt werden kann. Es ist interessant festzustellen, daß die Übergangsmetallsalze ($HgCl_2$, $ZnCl_2$) sehr gut komplexieren, was auch schon seit langem bekannt ist, aber dadurch auch die Reaktion sehr hemmen. Die Erdalkalihalogenide (außer Fluoride) verhalten sich inaktiv, da sie weder aktivieren noch desaktivieren. Die Magnesiumhalogenide (außer Fluorid) komplexieren aber so stark, daß kein Umsatz mehr stattfinden kann. Die Erdalkalifluoride aktivieren um 50 % die Reaktion. Am besten gehen die Alkalihalogenide in der Katalyse. Man beobachtet einen Kationeneffekt von Natrium zum Cäsium, der die Geschwindigkeitskonstante doch stark ansteigen läßt ($NaF\ 0.19 \cdot 10^{-1}$, $CsF\ 0.57 \cdot 10^{-1}$). Das kann damit erklärt

werden, daß Cäsiumsalze wegen des günstigen Ionenradius vom Cäsiumion besonders gut komplexiert werden. Der Anioneneffekt, der von den Chloriden zu den Jodiden auftritt, kann mit der Polarisierbarkeit der Ionen erklärt werden (CsCl $0.36 \cdot 10^{-1}$, CsJ $0.42 \cdot 10^{-1}$). Die Ausnahme bilden hier die Fluoride (CsF $0.57 \cdot 10^{-1}$) welche weit größere katalytische Wirkung besitzen. Zudem spielt die Konzentration der Alkalifluoride ebenfalls eine entscheidene Rolle. Die günstigsten Verhältnisse liegen bei einer $2 \cdot 10^{-3}$ molaren Konzentration, was aber auch nicht so sehr überrascht, da 2:1- (Metallsalz:POE)-Komplexe durchaus sehr günstig sind. Die Geschwindigkeitskonstante verdoppelt sich gerade gegenüber der 10^{-3} molaren Konzentration ($0.98 \cdot 10^{-1}$ gegenüber $0.47 \cdot 10^{-1}$). Unübersichtlich wird es bei größerer Salzkonzentration, da keine Linearität der Reaktion mehr gegeben wird, und eine exakte Auswertung nicht mehr möglich ist. Es hat zumindest den Anschein, als nehme die Reaktionsgeschwindigkeit ab. Es kann aber durchaus sein, daß hier eine Verschiebung stattfindet und die Komplexierung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt wird. Der Vergleich des polymergebundenen Triglycins mit den analogen niedermolekularen Triglycinethylester zeigt deutlich einen Polymereinfluß. Zwar wird auch das niedermolekulare Peptid etwas katalysiert, doch weit weniger, als das polymere Peptid ($0.20 \cdot 10^{-1}$ bei KF gegenüber $0.47 \cdot 10^{-1}$).

In Zukunft wird es interessant sein, andere Polymerpeptide mit anderen Aktivestern bzw. Peptidaktivestern und gleichzeitiger Alkalifluoridkatalyse zu untersuchen.

Abb. 18: Schematische Darstellung der Komplexbildung und nachfolgende Reaktion



In der Abb. 18 wird der Mechanismus für die Aktivierung des BOC-GlyONP dargestellt. Das Metallkation erhöht durch seine elektrophile Kraft die Elektronendichte am Carbonylsauerstoffatom. Dadurch wird der Carbonylkohlenstoff aktiviert eine elektrophile Reaktion mit der Aminogruppe der N-terminalen Aminosäure vom POE-Peptid einzugehen. p-Nitrophenol wird dabei in Freiheit gesetzt und das Polymerpeptid um BOC-Glycin verlängert. Die Einlagerung

des Metallkations ins POE ist ebenfalls gut zu erkennen. Analog zu den Kronenethern, kommt auch hier dem Sauerstoffatom entscheidende Bedeutung zu. Die koordinative Bindung mit dem Metallkation geschieht mit dem freien Elektronenpaar des Sauerstoffs. Beim POE wird der Komplex auch am Ende des Moleküls gebildet. Dabei bilden die sechs letzten Sauerstoffatome ein Sechseck, wobei sich das Metallkation im Zentrum befindet. Beim POE-Peptid wird die letzte Koordinationsstelle durch die Aminogruppe der N-terminalen Aminosäure besetzt. Die Komplexierung der Übergangsmetallkationen (Zink und Quecksilber) und des Magnesiumkations gelingt so gut, daß die nachfolgende Reaktion der Aminogruppe mit BOC-GlyONP nicht mehr stattfindet. Bei allen anderen Metallkationen wird die Koordinationsstelle der Aminogruppe durch die Carbonylgruppe des BOC-GlyONP ersetzt. Damit wird die Grundlage geschaffen für einen schnelleren Reaktionsablauf.

VI. Experimenteller Teil

VI.1. Abkürzungen

POE(PEG)	: Polyethylenglycol
AS	: Aminosäure
Z	: Carbobenzoxycarbonyl-
BOC	: t-Butyloxycarbonyl-
MbH	: 4'4-Dimethoxybenzhydryl-
Bzl	: Benzyl-
-ONP	: p-Nitrophenyl-
DCC	: Dicyclohexylcarbodiimid
DC-Harnstoff	: Dicyclohexylharnstoff
TFA	: Trifluoressigsäure
HAc	: Essigsäure
CH_2Cl_2	: Methylenchlorid
THF	: Tetrahydrofuran
DMF	: Dimethylformamid
DMSO	: Dimethylsulfoxid
TFE	: Trifluorethanol
AcCN	: Acetonitril
EtOH	: Ethanol
HMPT	: Hexamethylphosphorsäuretriamid
NMM	: N-Methylmorpholin
TÄA	: Triethylamin
TB	: Triton-B
Ä	: Diethylether
Pd/C	: Palladium/Aktivkohle
IR	: Infrarot
UV	: Ultraviolett
mM	: Millimol
min	: Minuten
h	: Stunden
RT	: Raumtemperatur

VI.2. Verwendete Geräte

IR-Spektrograph Perkin-Elmer Infracord
UV-Spektrometer Beckman DK II
Aminosäureanalysator Beckman Unichrom
Aminosäureanalysator Beckman Multichrom
UV-IS UV-Lampe Firma Desaga
Fraktionssammler mit optischer Einheit UA 5 ISCO
Fraktionssammler LKB 7000 Ultrorac mit optischer Einheit Uvicord I und Uvicord III
Autotitrator TTT 1 Radiometer Copenhagen mit Schreiber Typ SBR 2 c

Für die kinetischen Messungen werden folgende Geräte verwendet:

Registrierender Spektralphotometer DMR 21 WL Firma Zeiss
Zeiss-Spektralphotometer PMQ II mit Doppelmonochromator MM 12 und Spaltautomatik
1 mm Quarzküvetten mit Teflonstopfen der Firma Hellma Nr. 110 QS
10 ml Meßkölbchen der Firma Bachofer

VI.3. Chemikalien und Lösungsmittel

Acetonitril wird über Molekularsieb 3 Å aufbewahrt.

Methylenchlorid wird über K_2CO_3 destilliert und über Molekularsieb 4 Å aufbewahrt.

Ethanol wird mit Natrium und Phtalsäurediethylester am Rückfluß gekocht, destilliert und über Molekularsieb 3 Å aufbewahrt.

DMF wird durch azeotrope Destillation (1 l DMF, 120 ml Benzol und 50 ml Wasser) vorgetrocknet und über Calciumhydrid dann destilliert.

DMSO wird mit Hilfe von Molekularsieb 4 Å wasserfrei gemacht.

HMPT wird direkt eingesetzt.

Diethylether = Ether wird über eine Natriumdispersion destilliert.
Die Natriumdispersion ist eine äquivalente Mischung aus Paraffin und Natrium, welche in der Wärme und Rühren erreicht wird.

Essigsäure wird über Phosphorpentoxid vorgetrocknet und anschließend destilliert.

DCC wird im Hochvakuum destilliert und als 2 M Lösung in Methylenchlorid eingesetzt.

Das POE = PEG stammt von den Firmen Roth, Chemische Werke Hüls und Höchst. Es wird vor Gebrauch zweimal mit Ether aus CH_2Cl_2 umgefällt und am Hochvakuum getrocknet.

Die Aminosäuren stammen von der Firma E. Merck.

Fluram liefert die Firma Hoffmann-La Roche.

Sephadex LH 20 wird bei der Firma Pharmacia gekauft.

DC-Platten Kieselgel 60 mit und ohne Fluorescenzindikator werden von der Firma E. Merck bezogen.

BOC-Azid wird nach L. Carpino (258) synthetisiert.

N-Methylmorpholin stammt von der Firma E. Merck.

Triethylamin wird über Naphtylisocyanat gekocht und dann destilliert.

Triton-B stammt von der Firma E. Merck.

Tri-Glycinethylester · HCl wurde mir freundlicherweise von Herrn Diplomchemiker R. Eberle (96) zur Verfügung gestellt.

Die Alkali- und Erdalkalisalze stellt die Firma E. Merck her.

VI.4. Aminosäurederivate

Die nachfolgenden BOC-Aminosäuren werden nach pH-Stat-Methode von E. Schnabel (259) hergestellt.

BOC-Ala, BOC-Cys(Bzl), BOC-Gly, BOC-Leu, BOC-Phe, BOC-Tyr(Bzl), BOC-Val, BOC-GlyONP (96)

Weiterhin wird synthetisiert BOC-Asn(MbH), BOC-Glu(Bzl), BOC-Gln(MbH) nach der Vorschrift von Stewart-Young (260) und $(BOC)_2$-His (261).

Von den trifunktionellen Aminosäuren werden folgende Derivate hergestellt:
S-Benzylcystein (112), Glutaminsäurebenzylester (107, 108), O-Benzyltyrosin (102-106), H-Gln(MbH) (262), H-Asn(MbH) (262).
Die Schmelzpunkte und Drehwerte entsprechen mit geringen Abweichungen den Literaturangaben.

VI.5. Analytik

VI.5.1. Aminosäureanalyse (68)

1 µmol Peptid wird in ein Hydrolyseröhrchen eingewogen und mit 2-3 ml 6 n HCl versetzt. Ein geringer Zusatz von Phenol kann bei tyrosinhaltigen Peptiden bessere Ergebnisse liefern. Je nach Sequenz kann auch am Hochvakuum zugeschmolzen werden, wobei die Lösung mit flüssigem Stickstoff eingefroren wird. Die Hydrolyse erfolgt während 24 h bei 110° C. Danach wird im Vakuum bis zur Trockene eingeengt. Der Rückstand wird nach Spackmann und Moore (68) analysiert.

VI.5.2. Dünnschichtchromatographie

Als Laufsysteme werden eingesetzt:

n-Butanol : Eisessig : Wasser	=	3 : 1 : 1	(1)
Chloroform : Methanol	=	7 : 3	(2)
Ethanol : Wasser : Eisessig : Benzol	=	8 : 4 : 1 : 2	(3)
n-Butanol : Eisessig : Wasser : Pyridin	=	30 : 6 : 24 : 20	(4)

Zur Identifizierung werden folgende Reagenzien verwendet:

Ninhydrinlösung (68-70)

300 mg Ninhydrin werden in 100 ml n-Butanol und 3 ml Eisessig gelöst und das Chromatogramm wird dann mit dieser Lösung besprüht. Bei 110° C ergeben Aminogruppen nach 10 - 20 Min. die charakteristische rot-violette Färbung.

Chlor-Tolidin-Test (118)

80 mg o-Tolidin, 15 ml Essigsäure und 0,5 g KJ werden in Wasser auf 250 ml aufgefüllt. Das getrocknete Chromatogramm wird mit Wasserdampf befeuchtet, etwa 15 Min. in der Chlorkammer chloriert, mit Luft das überschüssige Chlor abgeblasen und mit dem Sprühreagenz versetzt.

Fluram-Test (73-76, 64)

Das Reagenz ist eine 0, 05 %ige Lösung von Fluram-Roche^{R} in Aceton. Zur Neutralisation wird das getrocknete Chromatogramm mit 5 %iger $NaHCO_3$-Lösung besprüht und mit der Reagenzlösung versetzt. Freie primäre Aminogruppen zeigen bei 366 nm eine charakteristische Fluoreszenz.

Dragendorff-Bürger-Reagenz (263, 264)

a) 1,7 g basisches Wismutnitrat werden in 20 ml Eisessig gelöst. Nach Zusatz von 80 ml Wasser, einer Lösung von 40 g KJ in 100 ml H_2O und 200 ml Eisessig wird mit H_2O auf 1000 ml aufgefüllt.

b) Bariumchlorid als 20 %ige Lösung
2 Teile a) und 1 Teil b) gemischt, ergeben das gewünschte Reagenz. PEG (POE) ergibt mit dem Reagenz eine charakteristische Gelbfärbung.

VI.6. Peptid-Synthese am Polymer

VI.6.1. Veresterung von Polyethylenglycol mit BOC-Glycin

a) Symmetrische Anhydride

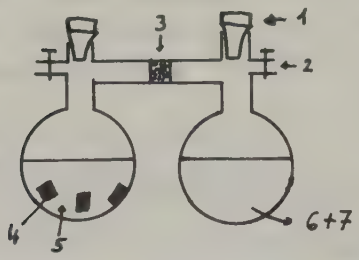
40 g POE (MG 20.000) = 3 mM funktionelle Gruppen werden in 100 ml CH_2Cl_2 gelöst. Währenddessen werden 5,6 g BOC-Gly = 32 mM funktionelle Gruppen in 50 ml CH_2Cl_2 gelöst, auf 0° C abgekühlt und mit 8 ml einer 2 M DCC-Lösung in CH_2Cl_2 eine halbe Stunde bei 0° C und eine halbe Stunde bei RT gerührt. Danach wird vom ausgefallenen DC-Harnstoff durch Absaugen befreit. Beide Lösungen werden vereinigt und 10 ml Pyridin hinzugefügt. Nach Einengung der Lösung auf 50 ml wird 4 Tage lang bei RT gerührt. Dann wird einrotiert, noch einmal in 50 ml CH_2Cl_2 aufgenommen und noch einmal 1 Tag gerührt. Es wird mit 200 ml Ether aus- und zweimal mit 50 ml CH_2Cl_2/200 ml Ether umgefällt.

Der Ninhydrin- und Cl_2/Tolidin-Test zeigen keine Überschüsse mehr an. Beladung des POE: 75 %

b) Natrium-Polyethylenglycol

Das POE wird zunächst in THF/Ether umgefällt und über P_2O_5 am Hochvakuum 4 Tage gut getrocknet, da unter absolutem H_2O-Ausschluß gearbeitet werden muß. Es werden 10 g POE (MG 20.000) in 1 l Schlenkrohr mit Glasfritte G 3 gegeben (links) und 400 ml THF zugefügt.

Abb. 19: Reaktionsgefäß für die Veresterung



1) Glasstopfen NS 29
2) N_2-Zufuhr bzw. Evakuierung
3) Glasfritte
4) Natrium
5) 200 ml THF
6) POE
7) 400 ml THF

Es werden 100-200 mg Natriumsuspension in die rechte Hälfte gegeben und mit 200 ml THF unter N_2 bzw. Argon versetzt. Dann wird unter Anlegen eines Vakuums die POE-Lösung über die Glasfritte zur Natriumsuspension übergeleitet und 1 h bei RT unter N_2-Atmosphäre gerührt. Auf die gleiche Weise wird das gelöste Na-POE von nicht umgesetzten Natrium getrennt. Unterdessen wird die entsprechende Menge BOC-Gly (8mM = 1,4 g) voraktiviert. Es wird in 50 ml THF gelöst, auf 0^{o} C abgekühlt, mit 2 ml einer 2 M DCC-Lösung in THF versetzt und eine halbe h bei 0^{o} C und eine halbe h bei RT gerührt. Diese Lösung wird unter Schutzgas und über einen Faltenfilter (Abtrennung des DC-Harnstoff) zur Na-POE-Lösung getropft. Es wird 2 Tage bei RT belassen. Danach wird mit 200 ml Ether aus- und mit 50 ml EtOH/200 ml Ether zweimal umgefällt.

Die Beladung am POE ist 94,5 %.

c) Aktivester und Metallsalzkatalyse

20 g POE (MG 20.000) werden in 100 ml Acetonitril (AcCN) gelöst und mit 480 mg KF 2 h komplexiert (klare Lösung). Dann werden 600 mg BOC-GlyONP zugesetzt und 2 Tage reagieren lassen. Dann wird mit 200 ml Äther ausgefällt, in 50 ml CH_2Cl_2 aufgenommen, wobei das KF wieder zum größten Teil ausgefällt und durch mehrmaliges Zentrifugieren abgetrennt wird. Nach dem Ausfällen mit Äther zeigt das DC keine Überschüsse mehr an.

Die Beladung ist zu 100 % am POE gelungen.

VI.6.2. Abspaltung der BOC-Gruppe

20 g Polymerpeptid werden in 150 ml 1,2 n HCl/HAc eine halbe h bei RT gerührt, einrotiert, mit Äther ausgefällt und zweimal mit 50 ml CH_2Cl_2/200 ml Äther umgefällt.

VI.6.3. Die Kupplung

30 g Polymerpeptid werden in 100 ml CH_2Cl_2, DMF, DMSO oder HMPT gelöst und mit der voraktivierten AS (siehe V. 6.1. a) versetzt. Das Anhydrid der AS wird immer im 3-fachen Überschuß (18 mM der BOC-AS) eingesetzt. Anschließend wird die Lösung mit 0,38 ml NMM neutralisiert. Man kann die Base auch schon zu der aktivierten BOC-AS geben. Nach 15 Min. wird eine Probe der Lösung auf eine DC-Platte Kieselgel 60 im System n-Butanol/Eisessig/Wasser (3:1:1) chromatographiert. Die Platte wird mit Fluram entwickelt. Zeigt der Startfleck keine Fluoreszenz, ist der Umsatz größer als 99 %. Nach 2 h wird das Polymerpeptid mit Ether gefällt, abfiltriert und mit Ether gewaschen. Es wird noch zweimal mit 50 ml CH_2Cl_2/200 ml Ether umgefällt, und danach ist das Polymerpeptid rein. Dies wird durch die

Dünnschichtchromatographie im Laufmittel n-Butanol/Eisessig/H_2O (3:1:1) bestätigt, wo nur der Startfleck (POE-Peptid) mit den Anfärbereagentien Ninhydrin und Chlor-Tolidin sichtbar ist.

VI.6.4. Darstellung der Ankergruppen

a) Ausgangsprodukte

Brommethylbenzoesäure (265)

54,4 g (400 mM) p-Toluylsäure werden in 600 ml siedendem Benzol gelöst. Unter Bestrahlung mit einer 100 Watt Lampe werden im Verlauf von 4 h 64 g (400 mM) Brom zugetropft. Noch während der Zugabe von Brom fällt ein Teil der bromierten Säure bereits aus. Nach Beendigung der Bromzugabe wird die Lösung noch 1 h am Sieden gehalten. Beim Erkalten kristallisiert die p-Brommethylbenzoesäure aus, die dann nach Trocknung aus Essigester umkristallisiert wird.

Ausbeute :63,5 g = 75 % d.Th.
Literatur (265): 224-226° C
Schmelzpunkt : 225-227° C

p-Brommethylbenzoesäurechlorid (147)

21,5 g (0,1 Mol) p-Brommethylbenzoesäure werden mit 0,15 Mol Thionylchlorid unter Rückfluß und Feuchtigkeitsausschluß gekocht, bis die Gasentwicklung beendet ist (ca. 6 h). Dann destilliert man das überschüssige Thionylchlorid im Wasserbad ab. Zur Entfernung letzter Reste Thionylchlorid wird das Produkt aus Petrolether (60-90) kristallisiert.

Ausbeute : 21 g = 90 % d.Th.
Literatur : 56° C (147)
Schmelzpunkt : 57° C

b) Fixierung des Ankers am $POE_{20.000}$-Gly·HCl

Umsetzung von POE ·Gly·HCl mit p-Brommethylbenzoesäure

6,45 g p-Brommethylbenzoesäure (10 mM) werden in 50 ml DMF gelöst und analog V. 6.1.a mit 2,5 ml einer 2 M DCC-Lösung voraktiviert. 30 g nach VI.1. dargestelltes POE-Gly·HCl werden in 100 ml DMF gelöst und mit 0,38 ml NMM neutralisiert. Dann wird eine Woche bei RT stehen gelassen und danach noch einmal mit 0,38 ml NMM neutralisiert. Danach können mit Fluram und Ninhydrin keine freien Aminogruppen mehr nachgewiesen werden. Das Polymer wird mit 200 ml Ether ausgefällt. Nach dreimaligem Umfällen mit 50 ml DMF/200 ml Ether und dreimaligem Zentrifugieren einer CH_2Cl_2-Lösung ist das Produkt im DC einheitlich. Als Laufmittel dient Butanol/Eisessig/H_2O (3:1:1).

Umsetzung von HCl·Gly-$POE_{20.000}$ mit p-Brommethylbenzoesäurechlorid

Zu einer Lösung von 30 g POE-Gly·HCl (nach VI.6.1. dargestellt) (3 mM) in 100 ml DMF gibt man 2,1 g (9 mM) p-Brommethylbenzoesäurechlorid. Nach der Neutralisation mit 0,38 ml NMM ist die Reaktion innerhalb von 10 Min. beendet. Mit Fluram und Ninhydrin können danach keine freien Aminogruppen mehr nachgewiesen werden. Das Polymer wird mit 200 ml Ether ausgefällt, noch dreimal mit 50 ml DMF/ 200 ml Ether umgefällt und dreimal als CH_2Cl_2-Lösung zentrifugiert. Dann ist das Produkt im DC einheitlich. Als Laufmittel dient Butanol/Eisessig/Wasser (3:1:1).

c) Direkte Veresterung der Ankergruppe

50 g $POE_{20.000}$ (5 mM) und 3,5 g p-Brommethylbenzoesäurechlorid (15 mM) werden in 300 ml Toluol gelöst und unter Feuchtigkeitsausschluß 12 h am Rückfluß gekocht. Dabei werden 5 ml Pyridin zur Bindung des entstehenden Chlorwasserstoffs zugesetzt. Dann wird das Polymer mit 200 ml Ether ausgefällt. Das Polymer wird nun wieder in CH_2Cl_2 aufgenommen, wobei das unlösliche p-Brommethylbenzoesäurechlorid ausfällt. Es wird durch Zentrifugieren abgetrennt. Dann zeigt die Dünnschichtchromatographie im Laufmittel Butanol/Eisessig/Wasser (3:1:1) ein einheitliches Produkt. Als Anfärbereagentien dienen Ninhydrin und Chlor-Tolidin.

VI.6.5. Kupplung der C-terminalen Aminosäure an das Brombenzylpolymer

a) Darstellung des Cäsiumsalzes der BOC-Aminosäure

10 mM BOC-AS werden in 50-100 ml H_2O suspendiert und langsam mit 5 mM Cs_2CO_3 versetzt. Nach Beendigung der CO_2-Entwicklung wird die Lösung klar. Sie wird mit flüssigem Stickstoff eingefroren und lyophilisiert.

b) Kupplung des Cäsiumsalzes der BOC-Aminosäure an das Brombenzylpolymer

Ein vierfacher Überschuß des Cäsiumsalzes der BOC-Aminosäure wird in 50 ml DMF gelöst. Gleichzeitig wird das Brombenzylpolymer (Darstellung nach VI.6.4. b bzw. c) in 100 ml DMF gelöst. Beide Lösungen werden vereinigt. Dann wird die Lösung bei 40°C im Dunkeln gerührt. Das ausgefallene CsBr wird abzentrifugiert, das Polymer mit 200 ml Ether ausgefällt und das weiße kristalline Polymer wieder in CH_2Cl_2 gelöst. Dabei fällt wieder CsBr aus,

welches wieder abzentrifugiert wird. Danach ist das Produkt einheitlich im Laufmittel Butanol/Eisessig/Wasser (3:1:1). Als Anfärbereagentien dienen Ninhydrin und Chlor-Tolidin.

VI.6.6. Synthese der Sequenz 13-20 von Insulin B am POE 3.000

Der POE-Glycinester wird stufenweise nach den Vorschriften VI.6.1., VI.6.2. und VI.6.3. verlängert.

Die Tabelle 15 zeigt die Ergebnisse der Aminosäureanalyse, die nach jeder Kupplung zur Umsatzkontrolle durchgeführt werden. Die anderen Aminosäuren werden auf das C-terminale Glycin bezogen. Die Werte der einzelnen Aminosäuren schwanken zwar etwas, sind aber noch im Rahmen des Erträglichen.

Tabelle 15: ASA der einzelnen Syntheseschritte

Peptid	Gly	Cys(Bzl)	Val	Leu	Tyr	Ala	Glu
1	1						
2	1	0.77					
3	1	0.75	0.90				
4	1	0.80	0.96	0.94			
5	1	1.01	1.16	1.02	0.91		
6	1	0.88	0.97	2.06	0.84		
8	1	0.90	0.96	2.00	0.68	1.09	0.98

Die Tabelle 16 gibt die Bedingungen für den Kupplungsschritt und Abspaltung der BOC-Gruppe.

Tabelle 16: Synthesebedingungen

POE	Kupplung mit Derivat	OS an Anhydrid mM	Kupplung in LM	ml LM	Dauer h	Zahl der Fäll.	BOC-Abspaltung ml	LM	Dauer Min.	Zahl der Fäll.
Gly^{20}	BOC-Cys(Bzl)	3	CH_2Cl_2	100	2	3	150 ml	1,2 n HCl/HAc	30	3
Cys^{19}	BOC-Val	3	CH_2Cl_2	100	2	3	150 ml	1,2 n HCl/HAc	30	3
Val^{18}	BOC-Leu	3	CH_2Cl_2	100	2	3	150 ml	1,2 n HCl/HAc	30	3
Leu^{17}	BOC-Tyr(Bzl)	3	DMF	100	2	3	150 ml	1,2 n HCl/HAc	30	3
Tyr^{16}	BOC-Leu	3	DMF	100	2	3	150 ml	1,2 n HCl/HAc	30	3
Leu^{15}	BOC-Ala	3	DMF	100	2	3	150 ml	1,2 n HCl/HAc	30	3
Ala^{14}	BOC-Glu(Bzl)	3	DMF	100	2	3	150 ml	1,2 n HCl/HAc	30	3
Glu^{13}										

Die Verluste an Polymerpeptid betragen 10,5 g.

VI.6.6.1. Abspaltung des Oktapeptides mittels alkalischer Hydrolyse

1 g POE-Peptid (nach VI.6.6. dargestellt) wird in 20 ml 1 n NaOH aufgeschwämmt und unter Zusatz von 20 ml DMF gelöst. Diese Lösung wird 4 h bei RT gerührt. Danach wird mit 20 ml 1 n HCl neutralisiert. Das wasserunlösliche Peptid wird abzentrifugiert. Letzte Reste de s Polymers werden durch säulenchromatographische Trennung an Sephadex LH 20 abgetrennt. MeOH dient als Laufmittel. Die Rohausbeute an Peptid beträgt 200 mg. Aus der wässrigen Phase wird das

gelöste Polymer mit 50 ml Chloroform extrahiert, das Lösungsmittel abgezogen und die verbliebene Beladung am POE mit der Aminosäureanalyse bestimmt.

Beladung vor der Abspaltung: 80 %
Beladung nach der Abspaltung: 4 %

Die Abspaltung gelingt zu 94 %

Das Rohpeptid wird noch zweimal an Sephadex LH 20 gereinigt. Danach zeigt das DC nur noch einen Fleck. Als Laufmittel dienen hier:

a) Butanol/Eisessig/Wasser (3:1:1)
b) $CHCl_3$/MeOH (7:3)
c) EtOH/H_2O/HAc/Benzol (8:4:1:2)
d) Butanol/HAc/H_2O/Pyr (30:6:24:20).

Als Anfärbereagentien dienen Ninhydrin und Chlor-Tolidin. Der Nachweis auf POE mit dem Dragendorff-Reagenz ist negativ.

Die Ausbeute an Peptid beträgt 50 mg, was 20 % vom abgespaltenen Peptid entspricht.

Die Aminosäureanalyse zeigt die nachfolgenden Werte:

	Gly	Glu	Val	Leu	Tyr	Ala	Cys(Bzl)
theor.	1	1	1	2	1	1	1
gef.	0.99	0.99	0.99	2.00	0.73	0.99	--

Die Elementaranalyse zeigt die nachfolgenden Werte:

$C_{56}H_{83}N_8O_{15}S$ (1139)

theor.	C	59.00	H	7.28	N	9.83	O	21.09	S	2.80
gef.	C	59.00	H	7.42	N	9.67	O	21.67	S	2.62

Der Schmelzpunkt liegt bei 216° C.

Der Racemisierungstest liefert die folgenden Werte

	Ala	Val	Leu	Glu	Tyr
%-D	2.2	2.5	2.3	3.2	2.5

VI.6.7. Synthese von POE-Gly-Anker-Insulin B 13-20 in CH_2Cl_2

Der POE-Gly-Anker-Glycinester wird analog nach den Vorschriften VI.6.1., VI.6.2. und VI.6.3. stufenweise verlängert.

Die Tabelle 17 zeigt die Ergebnisse der Aminosäureanalysen, die nach jeder Kupplung durchgeführt werden. Glycin dient als Bezugspunkt. Trotz einiger Schwankungen sind die Werte befriedigend.

Tabelle 17: ASA der Syntheseschritte

Peptid	Gly	Cys(Bzl)	Val	Leu	Tyr	Ala	Glu
1	1						
3	1	---	1.00				
5	1	---	0.94	0.99	1.06		
6	1	---	0.91	2.00	1.00		
8	1	0.98	1.00	2.00	0.91	1.00	1.00

Die Verluste an Polymerpeptid betragen 3,5 g.

Die Tabelle 18 zeigt die Bedingungen für den Kupplungsschritt und für die BOC-Gruppen-Abspaltung.

Tabelle 18: Synthesebedingungen

POE	Kupplung mit Derivat	OS an Anhydrid mM	Kupplung in LM	ml LM	Dauer h	Zahl der Fäll.	BOC-Abspaltung ml LM		Dauer Min.	Zahl der Fäll.
Gly^{20}	BOC-Cys(Bzl)	3	CH_2Cl_2	100	2	3	150 ml	1,2 n HCl/HAc	30	3
Cys^{19}	BOC-Val	3	CH_2Cl_2	100	2	3	150 ml	1,2 n HCl/HAc	30	3
Val^{18}	BOC-Leu	3	CH_2Cl_2	100	2	3	150 ml	1,2 n HCl/HAc	30	3
Leu^{17}	BOC-Tyr(Bzl)	3	DMF	100	2	3	150 ml	1,2 n HCl/HAc	30	3
Tyr^{16}	BOC-Leu	3	DMF	100	2	3	150 ml	1,2 n HCl/HAc	30	3
Leu^{15}	BOC-Ala	3	DMF	100	2	3	150 ml	1,2 n HCl/HAc	30	3
Ala^{14}	BOC-Glu(Bzl)	3	DMF	100	2	3	150 ml	1,2 n HCl/HAc	30	3
Glu^{13}										

VI.6.7.1. HBr-Abspaltung vom polymeren Träger

1 g Polymerpeptid (nach V.6.7. dargestellt) wird in 100 ml TFA gelöst, 1 ml Anisol zugefügt und 1 h bei RT mit HBr behandelt. Mit Stickstoff wird der überschüssige Bromwasserstoff abgeblasen. Die TFA wird abgezogen und der verbleibende Rest wird mit 100 ml H_2O versetzt. Danach wird mit einer gesättigten NH_4HCO_3-Lösung neutralisiert. Das Anisol wird dreimal mit 50 ml Ether extrahiert. Mit Chloroform wird das Polymer aus der wässrigen Phase extrahiert. Die Aminosäureanalyse ergibt die verbliebene Beladung am Polymer.

Beladung vor der Abspaltung: 25 %
Beladung nach der Abspaltung: 12.5 %
Ergebnis der Abspaltung: 50 %

Das wasserunlösliche Peptid wird durch Lyophilisation der wässrigen Phase als Rohprodukt erhalten. Ausbeute: 10 mg. Letzte Reste von POE und sonstige Nebenprodukte werden durch mehrmaliges Chromatographieren mit Methanol an Sephadex LH 20 abgetrennt. Die Ausbeute an Reinpeptid beträgt 1 mg = 10 % vom abgespaltenen Rohprodukt. Das Peptid ist in den Laufmitteln (1-4) einheitlich (Laufmittel vgl. VI.5.2.). Als Anfärbereagentien dienen Ninhydrin und Chlor-Tolidin. Mit dem Dragendorff-Reagens kann kein POE nachgewiesen werden. Die Abspaltung wird mit mehr Polymerpeptid wiederholt, um mehr Peptid zu erhalten. Die Ergebnisse stimmen gut überein.

Das reine Peptid hat einen Schmelzpunkt von 256° C.

Die Aminosäureanalyse zeigt die folgenden Ergebnisse.

	Gly	Glu	Ala	Val	Leu	Tyr
theor.	1	1	1	1	2	1
gef.	1.00	0.92	0.93	0.98	2.00	0.52

Als Bezugspunkt dient wieder das C-terminale Glycin.

Racemisierungstest:

	Ala	Val	Leu	Tyr	Glu
%-D	2.2	1.9	1.8	1.0	1.3

Elementaranalyse:

$C_{46}H_{69}N_8O_{14}S$ (989)

ber.	C	55.81	H	6.98	N	11.32	O	22.65	S	3.23
gef.	C	55.76	H	6.83	N	11.56	O	22.44	S	3.41

VI.6.8. Synthese von POE-Anker-Insulin B 13-20 in HMPT

Der POE-Anker-Glycinester wird analog den Vorschriften VI.6.1., VI.6.2. und VI.6.3. stufenweise verlängert.

Die Tabelle 19 zeigt die Ergebnisse der Aminosäureanalyse, die auf das C-terminale Glycin bezogen sind. (S-Bzl)-Cys konnte nicht bestimmt werden, da die Benzylschutzgruppe teilweise abgespalten wird. Beim Hexa- bzw. Heptapeptid ist die Hydrolyse nur unvollständig gewesen. Dadurch erklären sich die kleinen Werte für Val und Leu. Beim Oktapeptid sind die Ergebnisse wieder zufriedenstellend.

Tabelle 19: ASA der Syntheseschritte

Peptid	Gly	Val	Tyr	Ala	Glu	Leu
2	1					
3	1	0.90				
4	1	0.90				0.77
5	1	0.91	0.46			0.90
6	1	0.43	0.39			1.41 (2)
7	1	0.33	0.20	0.63		0.98 (2)
8	1	1.00	0.71	1.06	0.76	1.96 (2)

Die Tabelle 20 zeigt die Bedingungen für den Kupplungsschritt und Abspaltung der BOC-Gruppe.

Tabelle 20: Synthesebedingungen

POE	Kupplung mit Derivat	OS an Anhydrid mM	Kupplung in LM	ml LM	Dauer h	Zahl der Fäll.	BOC-Abspaltung ml	LM	Dauer Min.	Zahl der Fäll.
Gly^{20}	BOC-Cys(Bzl)	3	HMPT	250	2	3	150 ml	1,2 n HCl/HAc	30	3
Cys^{19}	BOC-Val	3	HMPT	250	2	3	150 ml	1,2 n HCl/HAc	30	3
Val^{18}	BOC-Leu	3	HMPT	150	2	3	150 ml	1,2 n HCl/HAc	30	3
Leu^{17}	BOC-Tyr(Bzl)	3	HMPT	150	2	3	150 ml	1,2 n HCl/HAc	30	3
Tyr^{16}	BOC-Leu	3	HMPT	150	2	3	150 ml	1,2 n HCl/HAc	30	3
Leu^{15}	BOC-Ala	3	HMPT	150	2	3	150 ml	1,2 n HCl/HAc	30	3
Ala^{14}	BOC-Glu(Bzl)	3	HMPT	150	2	3	150 ml	1,2 n HCl/HAc	30	3
Glu^{13}										

VI.6.8.1. HF-Abspaltung des Oktapeptides

a) Es werden 2,5 g Polymerpeptid (nach VI.6.8. hergestellt) mit kondensiertem HF (10 ml) bei 0° C 1,5 h gerührt, wobei noch 1 ml Anisol zugefügt wird. Mit N_2 wird das restliche HF abgeblasen. Letzte Reste werden im Vakuum über KOH entfernt. Die verbleibende, feste Substanz wird mit 5 ml CH_2Cl_2/MeOH (1:1) herausgelöst, einrotiert, lyophilisiert und mit MeOH über Sephadex LH 20 gelchromatographiert (330 mg werden in 4 ml DMF gelöst und auf die Säule gegeben). Die Abb. 20 zeigt ein typisches Chromatogramm für die Abtrennung des POE und der Verunreinigungen (siehe VI.6.9.1.).

b) Es werden 2,5 g Polymerpeptid (nach VI.6.8. hergestellt) in 10 ml kondensiertem HF bei 0° C 2 h gerührt, wobei noch etwas Anisol zugegen ist (1 ml). Mit N_2 wird das restliche HF abgeblasen. Letzte Reste werden im Vakuum über KOH entfernt. Die feste Substanz wird mit 5 ml CH_2Cl_2/MeOH (1:1) herausgelöst. Danach wird einrotiert, der Rückstand mit 100 ml H_2O aufgeschlämmt und mit einer gesättigten NH_4HCO_3-Lösung neutralisiert. Das wasserunlösliche Peptid wird abzentrifugiert. Dann wird aus der wässrigen Phase mit 3 x 50 ml Ether das Anisol extrahiert. Das Polymer wird aus der wässrigen Phase mit Chloroform ausgeschüttelt. Die Aminosäureanalyse gibt das Ergebnis für die HF-Abspaltungen (a bzw. b).

Beladung vor der Abspaltung:	61 %
Beladung nach der Abspaltung:	34 %
Ergebnis der Abspaltung:	44 %

Letzte Reste von POE werden beim Peptid durch säulenchromatographische Trennung an Sephadex LH 20 abgetrennt. Die Ausbeute an Rohpeptid nach der Abspaltung waren 50 mg. Nach der Aufarbeitung werden 9 mg reines Peptid erhalten (18 % vom abgespaltenen Rohpeptid).
Die Aminosäureanalyse zeigt die folgenden Werte (bezogen auf das C-terminale Glycin).

	Gly	Glu	Ala	Val	Leu	Tyr
theor.	1	1	1	1	2	1
gef.						
1. Absp.	1.00	1.00	1.00	1.00	2.00	0.5
2. Absp.	1.00	1.00	1.00	1.00	2.00	0.5

Die Racemisierung der Aminosäuren zeigt die folgenden Werte.

	Ala	Val	Leu	Glu	Tyr
%-D					
1. Absp.	3.3	1.9	1.3	2.3	0.7
2. Absp.	2.2	2.9	1.4	2.9	1.1

Der Schmelzpunkt liegt bei 258° C (1. Absp.) bzw. 255°C (2. Absp.).

Die Elementaranalyse erbringt folgende Ergebnisse:

$C_{46}H_{69}N_8O_{14}S_1$ (989)

theor.	C 55.81	H 6.98	N 11.32	O 22.65	S 3.23
gef.	C 55.57	H 6.70	N 9.14	O 25.52	S 3.07

Die Einheitlichkeit des Peptides wird in der Dünnschichtchromatographie gut erkannt. Als Laufmittel dienen (1) Butanol/Eisessig/H_2O (3:1:1), (2) $CHCl_3$/MeOH (7:3), (3) EtOH/H_2O/ Eisessig/Benzol (8:4:1:2), (4) Butanol/Eisessig/H_2O/Pyridin (30:6:24:20) und als Anfärbereagentien Ninhydrin und Chlor-Tolidin. Der Nachweis auf POE mit dem Dragendorff-Reagenz ist negativ.

V.6.9. Synthese von POE-Anker-Insulin B 13-20 in DMF

Der POE-Anker-Glycinester wird stufenweise nach den Vorschriften VI.6.1., VI.6.2. und VI.6.3. verlängert.

Die Tabelle 21 zeigt die Ergebnisse der Aminosäureanalyse, die nach jedem Kupplungsschritt durchgeführt wird. Während dieser Synthese stimmen die Werte für die einzelenen Aminosäuren recht gut überein.

Tabelle 21: ASA der Syntheseschritte

Peptid	Gly	Val	Leu	Tyr	Ala	Glu
1	1					
2	1					
3	1	0.98				
4	1	0.89	0.84			
5	1	0.94	0.97	1.22		
6	1	0.84	1.94	0.83		
7	1	0.86	1.94	0.77	1.50	
8	1	0.97	2.00	0.63	1.45	1.06

Die Tabelle zeigt die Bedingungen für den Kupplungsschritt und Abspaltung der BOC-Gruppe. (Tabelle 22)

Tabelle 22: Synthesebedingungen

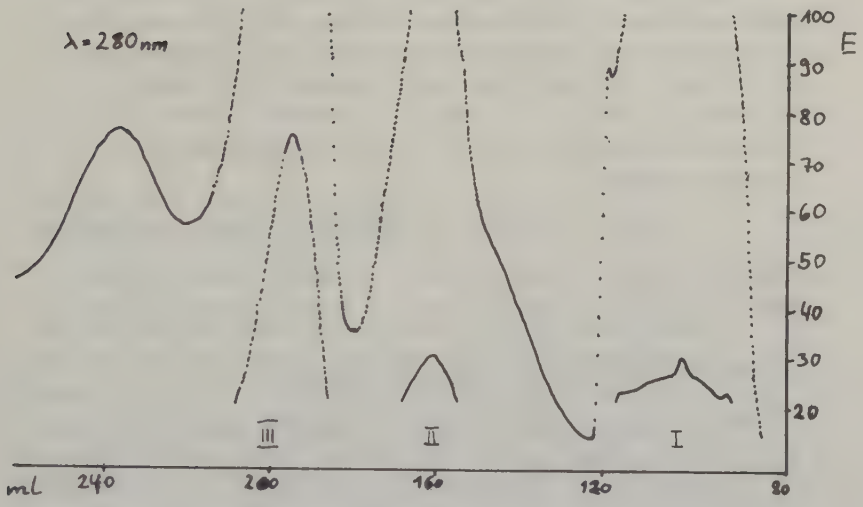
PDE	Kupplung mit Derivat	DS an Anhydrid mM	Kupplung in LM	ml LM	Dauer h	Zahl der Fäll.	BOC-Abspaltung ml	LM	Dauer Min.	Zahl der Fäll.
Gly^{20}	BOC-Cys(Bzl)	3	DMF	100	2	3	150 ml	1,2 n HCl/HAc	30	3
Cys^{19}	BOC-Val	3	DMF	100	2	3	150 ml	1,2 n HCl/HAc	30	3
Val^{18}	BOC-Leu	3	DMF	100	2	3	150 ml	1,2 n HCl/HAc	30	3
Leu^{17}	BOC-Tyr(Bzl)	3	DMF	100	2	3	150 ml	1,2 n HCl/HAc	30	3
Tyr^{16}	BOC-Leu	3	DMF	100	2	3	150 ml	1,2 n HCl/HAc	30	3
Leu^{15}	BOC-Ala	3	DMF	100	2	3	150 ml	1,2 n HCl/HAc	30	3
Ala^{14} Glu^{13}	BOC-Glu(Bzl)	3	DMF	100	2	3	150 ml	1,2 n HCl/HAc	30	3

VI.6.9.1. Alkalische Hydrogenolyse (katalytisch)

a) 0,5 g Oktapeptid (nach VI.6.9. hergestellt) werden in 10 ml MeOH/TÄA (20:1) gelöst. 200 mg Pd/C-Katalysator werden in 50 ml MeOH aufgeschlämmt und zur Lösung langsam zugetropft. Durch die mit einem Quecksilberüberdruckventil nach außen abgeschlossene Apparatur wird ein Wasserstoffstrom geleitet. Die Hydrierdauer beträgt 8 h. Danach wird vom Katalysator abfiltriert, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen und der Rückstand in MeOH (4 ml + 1 ml DMF) aufgenommen. Durch Gelfiltration über Sephadex LH 20 werden die niedermolekularen Anteile abgetrennt und getrennt aufgearbeitet. Die Polymerfraktion wird mit 50 ml Ether aus- und dreimal mit 10 ml EtOH/50 ml Ether umgefällt.

Die Abb. 20 zeigt ein typisches Chromatogramm, wo das Polymer von den niedermolekularen Anteilen an Sephadex LH 20 abgetrennt wird. Als Laufmittel dient Methanol. Zunächst erscheint die POE-Phase (I), dann das Peptid (II) und zum Schluß das DMF (III).

Abb. 20: Typisches Chromatogramm für alle Abspaltungen



b) Die Hydrierung erfolgt analog VI.6.9.1. a. Es werden aber 2,5 g Oktapolymerpeptid in 50 ml MeOH/TÄA (20:1) gelöst. Nur die Aufarbeitung nach der Hydrierung wird variiert. Der einrotierte Rückstand wird in 100 ml H_2O aufgeschlämmt, das wasserunlösliche Peptid abzentrifugiert und das POE (und restliche POE-Peptid) mit Chloroform extrahiert. Die Aminosäureanalyse gibt die verbliebene Beladung am Polymer an.

Beladung vor der Abspaltung: 63 %
Beladung nach der Abspaltung: 16 %

Damit ist die Abspaltung zu 74 % gelungen. Das Rohprodukt kann in einer Ausbeute von 10 mg isoliert werden (a).bei b) sind es 50 mg. Nach der Reinigung des Peptides mittels

Säulenchromatographie an Sephadex LH 20 (Laufmittel Methanol) können 1 mg (a) bzw. 5 mg (b) isoliert werden, was einer Ausbeute von 10 % des Rohpeptides entspricht. Die Einheitlichkeit bestätigt auch die Dünnschichtchromatographie in den Laufmitteln 1-4 (vgl. VI.5.2.). Als Anfärbereagentien dienen Ninhydrin und Chlor-Tolidin. Der POE-Nachweis mit dem Dragendorff-Reagenz ist negativ.

Die Aminosäureanalyse zeigt folgende Ergebnisse (auf Glycin bezogen):

	Gly	Glu	Ala	Val	Leu	Tyr
theor.	1	1	1	1	2	1
gef.	1.00	0.99	1.01	1.02	2.00	0.67

Der Racemisierungstest zeigt die D-Anteile.

	Ala	Val	Leu	Glu	Tyr
%-D	1.8	3.1	1.4	3.0	0.9

Der Schmelzpunkt liegt bei 216° C.

Die Elementaranalyse liefert folgende Ergebnisse:

$C_{49}H_{77}N_8O_{15}S$ (1_049)

theor.	C	56.05	H	7.34	N	10.87	O	22.88	S	3.05
gef.	C	56.17	H	7.10	N	10.18	O	23.48	S	3.07

VI.6.9.2. Alkalische Hydrogenolyse im Autoklaven

0,5 g Polymerpeptid (nach VI.6.9. hergestellt) werden in 10 ml MeOH/TÄA (20:1) gelöst. 200 mg Pd/C-Katalysator werden in 50 ml MeOH aufgeschlämmt und zur Lösung zugetropft. Die Hydrierung wird im Autoklaven bei 50 Bar Wasserstoff-

druck unter Rühren 12 h durchgeführt. Danach wird vom Katalysator abfiltriert, das LM abgezogen und der Rückstand in MeOH (4 ml + 1 ml DMF) aufgenommen. Durch Gelfiltration über Sephadex LH 20 werden die niedermolekularen Anteile abgetrennt. Die Aufarbeitung erfolgt analog VI.6.8.1. a) bzw. b).

Die verbliebene Beladung am Polymer wird durch die Aminosäureanalyse bestimmt.

Beladung vor der Abspaltung: 63 %
Beladung nach der Abspaltung: 4 %

Die Abspaltung gelingt zu 94 %.

Die Ausbeute an Rohpeptid ist 90 mg. Nach dem Abtrennen von letzten POE-Resten mittels Säulenchromatographie an Sephadex LH 20 in Methanol verbleiben 5 mg Peptid = 18 % vom abgespaltenen Rohpeptid. Die Einheitlichkeit des Peptides wird durch die Dünnschichtchromatographie in den Laufmitteln 1-4 (vgl. VI.5.2.) bestätigt. Als Anfärbereagentien dienen Ninhydrin und Chlor-Tolidin. Der Nachweis auf POE ist negativ (Dragendorff-Reagenz).

Die Aminosäureanalyse zeigt folgende Werte (auf Glycin bezogen):

	Gly	Glu	Ala	Val	Leu	Tyr
theor.	1	1	1	1	2	1
gef.	1.00	0.88	1.00	0.92	1.92	0.62

Der Racemisierungstest liefert die D-Anteile.

	Ala	Val	Leu	Glu	Tyr
%-D	2.1	3.5	1.4	3.1	1.2

Der Schmelzpunkt liegt bei 216° C.

Die Elementaranalyse zeigt die folgenden Ergebnisse:

$C_{49}H_{77}N_8O_{15}S$ (1049)

ber.	C	56.05	H	7.34	N	10.87	O	22.85	S 3.05
gef.	C	56.00	H	7.30	N	10.99	O	22.85	S. 3.02

VI.6.10. Synthese von POE-Anker-Insulin B 13-20 in DMSO

Der POE-Anker-Glycinester wird stufenweise nach den Vorschriften VI.6.1., VI.6.2. und VI.6.3. verlängert.

Die Tabelle 23 zeigt die Ergebnisse der Aminosäureanalysen, die nach jedem Kupplungsschritt gemacht werden. Das Glycin dient wieder als Bezugspunkt. Die Aminosäuren Glycin und Valin erscheinen etwas zu hoch.

Tabelle 23: ASA der Syntheseschritte

Peptid	Gly	Val	Leu	Tyr	Ala	Glu
1	1					
3	1	0.34				
5	1	0.49	0.36	0.33		
6	1	1.02	2.27	0.36		
7	1	1.00	1.65	0.71	0.73	
8	1	1.00	1.65	0.78	0.77	0.80

Die Tabelle 24 zeigt die Bedingungen für den Kupplungsschritt und die Abspaltung der BOC-Gruppe.

Tabelle 24: Synthesebedingungen

POE	Kupplung mit Derivat	OS an Anhydrid mM	Kupplung in LM	ml LM	Dauer h	Zahl der Fäll.	BOC-Abspaltung ml	LM	Dauer Min.	Zahl der Fäll.
Gly^{20}	BOC-Cys(Bzl)	3	DMSO	100	2	3	150 ml	1,2 n HCl/HAc	30	3
Cys^{19}	BOC-Val	3	DMSO	100	2	3	150 ml	1,2 n HCl/HAc	30	3
Val^{18}	BOC-Leu	3	DMSO	100	2	3	150 ml	1,2 n HCl/HAc	30	3
Leu^{17}	BOC-Tyr(Bzl)	3	DMSO	100	2	3	150 ml	1,2 n HCl/HAc	30	3
Tyr^{16}	BOC-Leu	3	DMSO	100	2	3	150 ml	1,2 n HCl/HAc	30	3
Leu^{15}	BOC-Ala	3	DMSO	100	2	3	150 ml	1,2 n HCl/HAc	30	3
Ala^{14} Glu^{13}	BOC-Glu(Bzl)	3	DMSO	100	2	3	150 ml	1,2 n HCl/HAc	30	3

VI.6.10.1. Abspaltung durch saure, homogene Hydrogenolyse (katalytisch)

Der für die Hydrogenolyse benötigte Pd-Schutzkolloidkatalysator wird wie folgt dargestellt:

Zu 15 ml einer 2 %igen Lösung von Polyvinylpyrrolidon (Luviskol K 90 BASF) in Isopropanol gibt man 1 ml einer 1 %igen wässrigen $PdCl_2$-Lösung, verdünnt mit 15 ml Wasser und versetzt mit 0,5 ml einer 4 %igen Sodalösung. Die Lösung wird mit Wasserstoff innerhalb von 5 Min. reduziert.

0,5 g Polymerpeptid (nach VI.6.10. dargestellt) werden in 40 ml Isopropanol/AcOH (10:1) gelöst und zum Katalysator gegeben. Es wird 30 Min. mit H_2 hydriert. Dann wird keine H_2-Aufnahme mehr beobachtet. Danach wird die Lösung über eine Polysulfonmembran ultrafiltriert. Das Filtrat wird anschließend zur Trockene eingedampft.

Die Trennung des Peptides vom polymeren Träger erfolgt durch Säulenchromatographie an Sephadex LH 20 in Methanol. Die Aminosäureanalyse zeigt die verbliebene Beladung am Polymer an.

Beladung vor der Abspaltung: 60 %
Beladung nach der Abspaltung: 33 %

Die Abspaltung gelingt zu 45 % vom polymeren Träger. Die Ausbeute an Rohpeptid beträgt 20 mg. Nach einer zweimaligen Chromatographie an Sephadex LH 20 in Methanol erhält man 5 mg reines Peptid, was 20 % vom Rohpeptid sind. Die Einheitlichkeit des Peptides wird durch Dünnschichtchromatographie in den Laufmitteln 1-4 (vgl. VI.5.2.) bestätigt. Als Anfärbereagentien werden Ninhydrin und Chlor-Tolidin verwendet. POE kann mit dem Dragendorff-Reagenz nicht mehr nachgewiesen werden.

Die Aminosäureanalyse ergibt die folgenden Werte:

	Gly	Glu	Ala	Val	Leu	Tyr
theor.	1	1	1	1	2	1
gef.	1.00	0.99	0.98	0.98	2.00	0.65

Der Racemisierungstest erbringt folgende Ergebnisse:

	Ala	Val	Leu	Glu	Tyr
%-D	1.6	2.0	2.2	2.4	1.7

Der Schmelzpunkt liegt bei 215° C.

Die Elementaranalyse ergibt folgende Werte:

$C_{49}H_{77}N_8O_{15}S$ (1049)

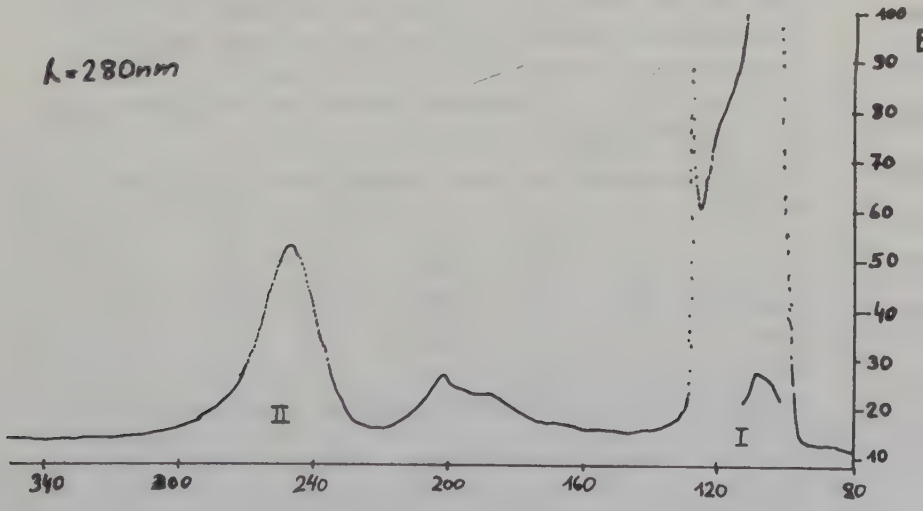
ber.	C	56.05	H	7.34	N	10.87	O	22.85	S 3.05
gef.	C	55.91	H	7.00	N	10.99	O	22.88	S 3.22

VI.6.10.2. Abspaltung vom polymeren Träger durch homogene, alkalische Hydrogenolyse

Der zu dieser Abspaltung benötigte Pd-Schutzkolloidkatalysator wird analog VI.6.10.1. dargestellt.

0,5 g Polymerpeptid werden in 40 ml Isopropanol/TÄA (20:1) gelöst und zum Katalysator gegeben. Dann wird 30 Min. in H_2-Atomosphäre gerührt und die Lösung analog VI.6.9.1. aufgearbeitet. Dabei stellt sich heraus, daß der Katalysator kaputt geht und nur Schutzgruppen abgespalten werden (siehe Abb. 21) Die Abb. 21 zeigt das Chromatogramm nach der alkalischen, homogenen Hydrogenolyse, wo die Reaktionsprodukte an Sephadex LH 20 in Methanol aufgetrennt werden. Der POE-Peak (I) und der Peak für die Schutzgruppen (II) sind deutlich sichtbar. Dagegen fehlt der Peptid-Peak.

Abb. 21: Chromatogramm der Abspaltungsprodukte
I = POE-Peptid
II = Schutzgruppen



VI.6.10.3. Abspaltung vom polymeren Träger durch homogene Hydrogenolyse

Die Darstellung des zur Hydrogenolyse benötigten Schutzkolloidkatalysators erfolgt analog VI.6.9.1.

1 g Polymerpeptid (nach VI.6.10. dargestellt) gelöst in 40 ml 50 %iger wässriger Isopropanollösung zum Katalysator gegeben. Dann wird 30 Min. in H_2-Atmosphäre gerührt und die Lösung analog VI.9.1. aufgearbeitet.

Die Aminosäureanalyse gibt die restliche Beladung am Polymer an.

Beladung vor der Abspaltung: 63 %
Beladung nach der Abspaltung: 33 %

Die Abspaltung beträgt: 48 %

Die Ausbeute an Rohpeptid beträgt 100 mg. Letzte Reste vom POE werden durch säulenchromatographische Trennung an Sephadex LH 20 abgetrennt. Als Laufmittel dient Methanol. Der POE-Nachweis mit dem Dragendorff-Reagenz ist danach negativ. Die Ausbeute an reinem Peptid beträgt 5 mg = 20 % vom Rohpeptid. Die Einheitlichkeit wird durch die Dünnschichtchromatographie bestätigt. Als Laufmittel dienen 1-4 (vgl. VI.5.2.) und als Anfärbereagentien Ninhydrin und Chlor-Tolidin.

Die Aminosäureanalyse zeigt folgende Werte (auf Glycin bezogen).

	Gly	Glu	Ala	Val	Leu	Tyr
theor.	1	1	1	1	2	1
gef.	1.00	1.00	0.98	1.00	2.02	0.77

Der Racemisierungstest zeigt folgende D-Anteile.

	Ala	Val	Leu	Glu	Tyr
%-D	1.5	1.6	1.4	1.5	0.5

Schmelzpunkt: 217° C

Die Elementaranalyse gibt folgende Ergebnisse:

$C_{49}H_{77}N_8O_{15}S$ (1049)

ber.	C	56,05	H	7.34	N	10.87	O	22.85	S 3.05
gef.	C	55.75	H	7.44	N	11.12	O	22.51	S 3.18

VI.6.11. Synthese von POE-Gly-Anker-Insulin B 13-20 in DMF

Das POE-Gly-Anker-Glycin wird stufenweise nach den Vorschriften VI.6.1., VI.6.2. und VI.6.3. verlängert.

Die Tabelle 25 zeigt die Aminosäureanalysen, die nach jedem Kupplungsschritt angefertigt werden. Da Glycin zu hoch erscheint, weil die Beladung am Polymer zwar vollständig, aber am Anker nur zur Hälfte gelingt, wird Leucin als Bezugspunkt gewählt.

Tabelle 25: ASA der Syntheseschritte

Peptid	Gly	Val	Leu	Tyr	Ala	Glu
1	2.33					
3	2.33	1.00				
4	2.61	1.00	1			
6	2.39	0.88	2	0.96		
7	2.27	0.95	2	1.05	1.00	
8	2.33	1.07	2	1.00	0.95	0.99

Die Tabelle 26 zeigt die Bedingungen für den Kupplungsschritt und Abspaltung der BOC-Gruppe.

Tabelle 26: Synthesebedingungen

POE	Kupplung mit Derivat	OS an Anhydrid mM	Kupplung in LM	ml LM	Dauer h	Zahl der Fäll.	BOC-Abspaltung ml LM	Dauer Min.	Zahl der Fäll.
Gly^{20}	BOC-Cys(Bzl)	3	DMF	100	2	3	150 ml 1,2 n HCl/HAc	30	3
Cys^{19}	BOC-Val	3	DMF	100	2	3	150 ml 1,2 n HCl/HAc	30	3
Val^{18}	BOC-Leu	3	DMF	100	2	3	150 ml 1,2 n HCl/HAc	30	3
Leu^{17}	BOC-Tyr(Bzl)	3	DMF	100	2	3	150 ml 1,2 n HCl/HAc	30	3
Tyr^{16}	BOC-Leu	3	DMF	100	2	3	150 ml 1,2 n HCl/HAc	30	3
Leu^{15}	BOC-Ala	3	DMF	100	2	3	150 ml 1,2 n HCl+HAc	30	3
Ala^{14}	BOC-Glu(Bzl)	3	DMF	100	2	3	150 ml 1,2 n HCl+HAc	30	3
Glu^{13}									

VI.6.11.1. Abspaltung durch homogene Hydrogenolyse

Die Abspaltung des Oktapeptids (nach VI.6.11. dargestellt) vom Polymer erfolgt analog VI.6.10.3. nur mit dem Unterschied, daß die H_2-Aufnahme erheblich schneller erfolgt.

Die Aminosäureanalyse bestimmt die verbliebene Beladung am Polymer.

Beladung vor der Abspaltung: 55 %
Beladung nach der Abspaltung: 5 %

Die Abspaltung gelingt zu 92 %

Die Ausbeute an Rohpeptid ist 80 mg. Letzte Reste von POE werden durch säulenchromatographische Trennung beseitigt. Das reine Peptid kann mit 10 mg = 20 % des Rohpeptides isoliert werden. Der Nachweis auf POE mit dem Dragendorff-Reagenz ist negativ. Die Einheitlichkeit des Peptids zeigt

auch die Dünnschichtchromatographie in den Laufmitteln 1-4 (vergl. VI.5.2.) wo Ninhydrin und Chlor-Tolidin als Anfärbereagentien dienen.

Die Aminosäureanalyse zeigt folgende Ergebnisse (auf Leucin bezogen)

	Leu	Glu	Gly	Ala	Val	Tyr
theor.	2	1	1	1	1	1
gef.	2	0.96	1.04	1.04	0.97	0.82

Der Racemisierungstest erbringt die D-Anteile:

	Ala	Val	Leu	Glu	Tyr
%-D	1.2	1.4	1.3	1.5	1.1

Der Schmelzpunkt liegt bei 216° C.

Die Elementaranalyse gibt folgende Ergebnisse:

$C_{49}H_{77}O_{15}N_8S$ (1049)

ber.	C	56.05	H	7.34	N	10.87	O	22.85	S 3.05
gef.	C	56.36	H	7.22	N	10.66	O	22.75	S 3.01

VI.6.11.2. Alkalische Abspaltung vom Polymer (Hydrolyse)

Die Abspaltung des Oktapeptids (nach VI.6.11. dargestellt) vom Polymer erfolgt analog VI.6.6.1. ohne Änderung.

Die Aminsäureanalyse bestimmt die verbliebene Beladung am Polymer.

Beladung vor der Abspaltung: 55 %
Beladung nach der Abspaltung: 4 %

Ergebnis der Abspaltung: 92,5 %

Die Rohpeptidausbeute ist 80 mg. Letzte Reste vom POE werden mittels Säulenchromatographie an Sephadex LH 20 in Methanol abgetrennt. Der Dragendorff-Test auf POE ist danach negativ. Das reine Peptid ist einheitlich, was die Dünnschichtchromatographie bestätigt in den Laufmitteln 1-4 (vgl. VI.5.2.). Als Anfärbereagentien dienen Ninhydrin und Chlor-Tolidin.

Ergebnis der Aminosäureanalyse (auf Leucin bezogen):

	Leu	Glu	Gly	Ala	Val	Tyr
theor.	2	1	1	1	1	1
gef.	2	1.06	1.09	1.00	1.00	0.77

Ergebnis des Racemisierungstestes:

	Ala	Val	Leu	Glu	Tyr
%-D	2.1	3.1	1.4	3.1	1.2

Schmelzpunkt: 215°C

Elementaranalyse:

$C_{56}H_{83}N_8O_{15}S$ (1139)

ber.	C	59.00	H	7.28	N	9.83	O	21.09	S	2.80
gef.	C	60.00	H	7.42	N	9.67	O.	20.29	S	2.62

VI.6.12. Synthese von POE-Gly-Anker-Insulin B 1-8 in CH_2Cl_2

Das POE-Gly-Anker-Glycin wird stufenweise nach den Vorschriften VI.6.1., VI.6.2. und VI.6.3. verlängert.

Die Tabelle 27 zeigt die Aminosäureanalyse, die nach jedem Kupplungsschritt durchgeführt wird. Als Bezugspunkt dient

Leucin, da das C-terminale Glycin zwar quantitativ am POE verestert ist, aber die Veresterung am Anker nur zur Hälfte gelang. Auffallend ist bei dieser Synthese, daß die Überschüsse nur schlecht abgetrennt werden konnten. So erscheint immer die N-terminale Aminosäure deutlich zu hoch. Beim Oktapolymerpeptid kann durch mehrmaliges Umfällen mit 50 ml EtOH/200 ml Ether eine befriedigende Aminosäureanalyse erhalten werden. Glycin erscheint während der ganzen Synthese aus den oben genannten Gründen zu hoch.

Tabelle 27: ASA der Syntheseschritte

Peptid	Gly	Leu	His	Glu	Asp	Val	Phe
1	2.28						
2	2.26						
3	2.25	1.00					
4	2.12	1.00	1.10				
5	2.41	1.00	0.99	1.56			
6	2.13	1.00	0.78	1.40	1.67		
7	2.23	1.00	0.91	1.15	1.11	1.33	
8	2.25	1.00	0.94	1.02	1.02	0.97	1.12

Die Tabelle 28 zeigt die Bedingungen für die Kupplung und Abspaltung der BOC-Gruppe.

Tabelle 28: Synthesebedingungen

POE	Kupplung mit Derivat	OS an Anhydrid	Kupplung in LM	ml LM	Dauer h	Zahl der Fäll.	BOC-Abspaltung ml	LM	Dauer Min.	Zahl der Fäll.
Gly^8	BOC-Cys(Bzl)	3 mM	CH_2Cl_2	150	2	3	150 ml	1,2 n HCl/HAc	30	3
Cys^7	BOC-Leu	3 mM	CH_2Cl_2	150	2	3	150 ml	1,2 n HCl/HAc	30	3
Leu^6	$(BOC)_2$-His	3 mM	CH_2Cl_2	150	24	3	150 ml	1,2 n HCl/HAc	30	3
His^5	BOC-Gln (Mbl)	3 mM	CH_2Cl_2	250	6	3	150 ml	1,2 n HCl/HAc	30	3
Gln^5	BOC-Asn (Mbl)	3 mM	CH_2Cl_2	400	6	3	150 ml	1,2 n HCl/HAc	30	3
Asn^3	BOC-Val	3 mM	DMF	100	2	2	150 ml	1,2 n HCl/HAc	30	3
Val^2	BOC-Phe	3 mM	DMF	100	2	3	150 ml	1,2 n HCl/HAc	30	3
Phe^1										

VI.6.12.1. Alkalische Abspaltung vom Polymer

Die Abspaltung vom polymeren Träger erfolgt analog der Vorschrift VI.6.6.1. ohne Änderung.

Die Ausbeute an Rohpeptid ist 60 mg. Letzte Reste von POE werden durch Säulenchromatographie an Sephadex LH 20 in Methanol abgetrennt. Danach kann mit dem Dragendorff-Reagenz kein POE mehr nachgewiesen werden. Die Einheitlichkeit des Peptides wird durch die Dünnschichtchromatographie in den Laufmitteln 1-4 (vgl. VI.5.2) bestätigt. Als Anfärbereagentien dienen Ninhydrin und Chlor-Tolidin. Die Ausbeute an reinem Peptid gelingt zu 25 % = 15 mg.

Die Aminosäureanalyse zeigt folgende Werte (auf Leucin bezogen)

	Leu	Asp	Glu	Gly	Val	Phe	His
theor	1	1	1	1	1	1	1
gef.	1	1.00	1.00	1.00	0.99	0.97	0.95

Der Racemisierungstest zeigt folgende Ergebnisse:

	Val	Leu	Phe	Glu	Asp
%-D	2.2	3.4	3.7	8.9	21.6

Schmelzpunkt: 231°C

Elementaranalyse:

$C_{81}H_{99}N_{10}O_{17}S$ (1515)

ber.	C	64.15	H	6.53	N	9.24	O	17.95	S	2.11
gef.	C	66.68	H	6.68	N	9.71	O	14.64	S	2.29

VI.6.13. Synthese von POE-Gly_3·HCl

Der POE-Glycinester wird stufenweise nach den Vorschriften VI.6.1., VI.6.2. und VI.6.3. verlängert.

Die Tabelle 29 zeigt die Ergebnisse der Aminosäureanalyse, die nach jedem Kupplungsschritt durchgeführt wird. Alle Umsetzungen sind quantitativ gewesen. Die Beladung von 1,2 µM anstatt 1 µM zeigt an, daß das Molekulargewicht vom POE kleiner ist als 20.000.

Tabelle 29: ASA der Syntheseschritte

Peptid	Gly
1	1.20 µM
2	2.40 µM
3	3.60 µM

Die Tabelle 30 gibt die Bedingungen wieder, die Kupplung und Abspaltung der BOC-Gruppe erfordern.

Tabelle 30: Synthesebedingungen

POE	Kupplung mit Derivat	DS an Anhydrid	Kupplung in LM	ml LM	Dauer Min.	Zahl der Fäll.	BOC-Abspaltung ml	LM	Zahl der Fäll.
Gly^3	BOC-Gly	3	CH_2Cl_2	100	30	3	150 ml	1.2 n HCl/HAc	3
Gly^2	BOC-Gly	3	CH_2Cl_2	100	30	3	150 ml	1.2 n HCl/HAc	3
Gly^1									

VI.7. Racemisierungstest

Zur Abspaltung vom Polymer und zur Hydrolyse wird etwa 0,2 µM Peptid mit 1 ml 6 n HCl versetzt, evakuiert und 24 h bei 110°C hydrolysiert. Dann wird einrotiert, in wenig H_2O aufgenommen (50 ml) und mit 50 ml CH_2Cl_2 das POE weitgehend entfernt. Danach wird erneut einrotiert und mit 0,5 ml 1,2 n HCl/Isopropanol 1 h bei 110°C verestert. Das LM wird mit N_2 abgeblasen und der verbliebene Rest wird mit 100 µl Pentafluorpropionsäureanhydrid bei 110°C 10 Min. N-acyliert.

Die nunmehr flüchtigen AS-Derivate werden gaschromatographisch in ihre Enantiomere getrennt.

VII. Zusammenfassung

Die Anwendung der Liquid-Phase-Peptidsynthese wird an einigen Beispielen untersucht. Zunächst werden verschiedene Ankergruppen getestet. Die Ankergruppe stellt ein Zwischenglied zwischen Polymer (POE) und Peptid dar. Hierzu wird die verwendete p-Bromtoluylsäure entweder direkt an das POE bzw. an das POE-Glycin kondensiert. Die Kupplung der C-terminalen Aminosäure Glycin erfolgt über dessen Cäsiumsalz. Der stufenweise Aufbau der Peptide wird nach dem üblichen Reaktionszyklus der Liquid-Phase-Methode durchgeführt. Als Modellpeptid dient die Sequenz 13-20 von Insulin B. Die Synthese der Polymer-Oktapeptide wird in verschiedenen Lösungsmitteln durchgeführt, um optimale Bedingungen zu erreichen. Es sind zwar alle verwendeten Lösungsmittel möglich, jedoch treten verschiedenartige Schwierigkeiten auf, die diskutiert werden. Zum Vergleich wird auch eine Peptidsynthese ohne Ankergruppe durchgeführt.

Den Verlauf der Peptidsynthese wird spektroskopisch mit der C-13 NMR-Methode nach jedem Kupplungsschritt verfolgt. Die Zuordnung der einzelnen Kohlenstoffresonanzen wird angegeben. Ebenso erbringt der Vergleich mit dem abgespaltenen Oktapeptid die erwarteten Resonanzen. An Hand der Spektren werden die Ergebnisse diskutiert.

Die Konformation des POE-Peptides wird durch CD-Messungen ermittelt, wobei die Auswertung nach verschiedenen Verfahren erfolgt. Eine mögliche Konformation wird diskutiert.

Die Abspaltung des Oktapeptides vom Ankerpolymer wird nach verschiedenen Verfahren durchgeführt. Es werden die saure und alkalische Hydrolyse, die alkalische Hydrogenolyse an einem Palladium/Aktivkohle-Katalysator und die

homogene Hydrogenolyse im sauren, neutralen und alkalischen Bereich an einem Palladium-Schutzkolloid-Katalysator durchgeführt. Der Vergleich der Abspaltung mit dem Polymerpeptid ohne Anker wird gemacht. Auch der Einfluß des Glycins als Zwischenglied zwischen POE und Ankergruppe wird aufgezeigt. Die Ergebnisse werden diskutiert. Die abgespaltenen Peptide werden durch säulenchromatographische Trennung an Sephadex-LH 20 gereinigt und charakterisiert. An Hand eines POE-Tripeptides wird der lineare Verlauf der Peptidkupplung mit einem Aktivester kinetisch verfolgt. Danach wird bei dieser Reaktion durch eine gezielte Metallsalzkatalyse eine Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit erreicht. Die Reaktion verläuft nach 2. Ordnung und die Geschwindigkeitskonstanten werden angegeben und diskutiert. Auch der Vergleich mit der analogen niedermolekularen Reaktion (Tripeptidester) mit dem Aktivester wird angegeben. Dadurch wird der Polymereinfluß (POE) auf die Peptidkupplung bestimmt.

LITERATURVERZEICHNIS

1) M. Mutter: Habilitationsschrift Tübingen 1976
2) E. Wünsch: Angew. Chem. 83, 773 (1971)
3) Th. Curtius: Ber. dtsch. chem. Ges. 35, 3226 (1902)
4) D.S. Kemp, Z. Bernstein & J. Rebek: J.Am.Chem.Soc. 92, 4756 (1970)
5) E. Schnabel: Liebigs Ann.Chem. 659, 168 (1962)
6) A. Honzel & W. Rudinger: Collection Czech.chem.Com.26, 2333 (1961)
7) A. Tilak & J.A. Hoffmann: J.Org.Chem. 42, 2098 (1977)
8) M. Bodanszky & V. du Vigneaud: J.Am.Chem.Soc. 81, 688 (1959)
9) M. Bodanszky, K.W. Funk & M.L. Fink: J.Org.Chem. 38, 3565 (1973)
10) G.W. Anderson, J.E. Zimmermann & F.M. Callahan: J.Am.Chem.Soc. 86, 1839 (1964)
11) J.C. Sheehan & G.P. Hess: J.Am.Chem.Soc. 77, 1067 (1955)
12) J. Rebek & D. Felder: J.Am.Chem.Soc. 96, 1606 (1974)
13) J. Rebek, D. Brown & S. Zimmermann: Peptides: Chemistry and Biochemistry: Proc. 4th Am.Pept.Symp. 1975, 371
14) W. König & R . Geiger: Chem. Ber. 103, 788 (1970)
15) M. Bergmann & L. Zervas: Ber. dtsch. chem. Ges. 65, 1192 (1932)
16) F.C. McKay & N.F. Abertson: J.Am.Chem.Soc. 79, 4686 (1957)
17) G.W. Anderson & A.C. McGregor: J.Am.Chem.Soc. 79, 6180 (1957)
18) E. Pietrzik, H. Kalbacher & W. Völter: Liebigs Ann. Chem. 1977, 609
19) L. Moroder, F. Dress, E. Jäger & E. Wünsch: Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 359, 147-164 (1978)
20) H. Eckstein & E. Bayer: Liebigs Ann. Chem. 1978, 1607
21) R. Schwyzer & P. Sieber: Helv. Chim. Acta 49, 134 (1966)
22) G. Losse: Z. Chem. 18, 330 (1978)

23) R. Geiger: Chemiker Z. 100, 111 (1976)
24) K. Lübke & H. Klostermeyer: Advances Enzymol. 33, 445 (1970)
25) R.B. Merrifield: J.Am.Chem.Soc. 85, 2149 (1963)
26) G.P. Mishin, G.A. Korshunova & Y.P. Shvachkin: Uspekhi Khimii 43, 2014 (1974)
27) G. Losse & K. Neubert: Z. Chem. 10, 48 (1970)
28) R.B. Merrifield: Biochemistry 3, 1385 (1964)
29) R.B. Merrifield: Advances Enzymol. 32, 221 (1969)
30) E. Bayer, H. Eckstein, K. Hägele, W.A. König, V. Brüning, H. Hagenmaier & W. Parr: J.Am.Chem.Soc. 92, 1735 (1970)
31) R.B. Merrifield: "Hypotensive Peptides", Springer-Verlag, New York 1966, 1
32) H. Eckstein: Dissertation Tübingen 1970
33) G. Losse, L. Madlung & P. Lorenz: Chem. Ber. 101, 1257 (1968)
34) N. Inukai, K. Nakano & M. Mura-Kami: Bull.Chem.Soc. Jp. 41, 182 (1968)
35) C.G. Horvat, B.A. Preiss & S.R. Lipsky: Anal.Chem. 39, 1422 (1967)
36) E. Bayer, E. Breitmaier, G. Jung & W. Parr: Peptides: Chemistry and Biochemistry: Proc. 2nd Amer.Pept. Symp. 1970
37) E. Bayer, H. Hagenmaier, G. Jung, W. Parr, H. Eckstein, P. Hunzicker & R.E. Sievers: Peptides 1969, 65, North Holland Publ. Comp. (1971)
38) E. Bayer, E. Breitmaier, G. Jung & W. Parr: Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 352, 759 (1971)
39) G.P. Vlasow, A.Yu. Bilibin: Izv. Akad. Nauk SSSR: Ser Khim 1969, 1400
40) M.M. Shemyakin, Y.A. Ovchinnikov, A.A. Kiriushkin & I.V. Kozhevnikova: THL 1965, 2323
41) R.H. Andreatta & R. Rink: Helv.Chem.Acta 56, 1205 (1973)
42) H. Frank, H. Meyer & H.P. Hagenmaier: Chemiker Z. 101, 188 (1977)

43) H. Frank, H. Meyer & H.P. Hagenmaier: Peptides: Chemistry and Biochemistry: Proc. 4th Am.Pept. Symp. 1975, 439
44) H. Frank, H.P. Hagenmaier, D.M. Desiderio: Peptides: Chemistry and Biochemistry: Proc. 5th Am.Peptd.Symp. 1978, 514
45) G. Jung, G. Bovermann, W. Göhring & G. Heusel: Peptides: Chemistry and Biochemistry: Proc. 4th Am.Pept.Symp. 1975, 433
46) G. Jung, G. Bovermann, W. Göhring & G. Heusel: Angew. Chem. 89, 681 (1977)
47) W. Göhring & G. Jung: Liebigs Ann.Chem. 1975, 1765-1789 (1975)
48) E. Bayer & M. Mutter: Nature 237, 512 (1972)
49) E. Bayer & M. Mutter: Chem. Ber. 107, 1344 (1974)
50) E. Bayer & M. Mutter: Angew. Chem. 86, 101 (1974)
51) M. Mutter, R. Uhmann & E. Bayer: Liebigs Ann.Chem. 1975, 901
52) M. Mutter, H. Hagenmaier & E. Bayer: Angew. Chem. 83, 883 (1971)
53) M. Mutter: Dissertation Tübingen 1972
54) H. Determann: Arch. Pharm. 303, 107 (1970)
55) Polydiole, Polywachse: Informationsschrift der Chem. Werke Hüls AG
56) M. Tadokoro: Makrom. Chem. 73, 109 (1964)
57) E. Bayer, M. Mutter & G. Holzer: Peptides: Chemistry and Biochemistry: Proc. 4th Am.Pept. Sympl. 1975 425
58) U. Heitmann: Dissertation Tübingen 1978
59) B. Kluth: Diplomarbeit Tübingen 1978
60) W. Schoknecht: Diplomarbeit Tübingen 1976
61) R. Uhmann: Dissertation Tübingen 1971
62) A. Groß & B. Labouesse: Europ. J. 7, 463 (1969)
63) W.R. Gray, B.S. Hartey: Biochem. J. 89, 361 (1963)
64) W. Stein: Dissertation Tübingen 1976
65) E. Bayer, E. Grom, B. Kaltenegger & R. Uhmann: Analyt. Chem. 48, 1106 (1976)

66) E. Bayer, E. Grom & R. Uhmann: Peptides: Chemistry and Biochemistry: Proc. 4th Am.Pept. Symp. 1975, 247
67) W. Göhring: Dissertation Tübingen 1974
68) D.H. Spackman, W.H. Stein & S. Moore: Analyt. Chem. 30, 1190 (1958)
69) K. Brunsfeld, J. Thomsen & P. Roepstorff: Acta chem. Scand. 23, 2906 (1969)
70) H. Hagenmaier & M. Mutter: THL 1974, 767
71) M. Schattenberg: Dissertation Tübingen 1974
72) O. Schou: Acta chem. Scand. B30, 991 (1976)
73) A. Felix & M.H. Jiminez: J. Chromat. 89, 361 (1974)
74) M. Weigele: J.Am.Chem.Soc. 94, 5927 (1972)
75) J.C. Touchstone, J. Sherma, M.F. Dobbins & G. Hansen: J. Chromat. 124, 111 (1976)
76) N. Nakamura: J. Chromat. 131, 215 (1977)
77) A.P. Ryle, F. Sanger, L.F. Smith & R. Kitai: Biochem. J. 60, 541 (1955)
78) G. Weitzel, U. Weber, S. Hörnle, K.H. Herzog, K. Eisele, M. Grossmann & J. Martin: Peptides 1971, 419, North-Holland Publ. Comp. (1973)
79) G. Weitzel, U. Weber, S. Hörnle & F. Schneider: Peptides 1968, 222, North-Holland Publ. Comp. (1968)
80) G. Weitzel, U. Weber & M. Andre: Peptides 1974, 153, North-Holland Publ. Comp. (1975)
81) T. Blundell, G. Dodson, E. Dodson, D. Hodgkin & M. Vijayan: Recent Prog. Hormon. Res. 27, 1 (1971)
82) T. Blundell, G. Dodson, D. Hodgkin & D. Mercola: Adv. Prot. Chem. 26, 269 (1972)
83) T. Blundell, J. Gutfield, S. Gutfield, G. Dodson, D. Dodson, D. Hodgin & D. Mercola: Peptides 1972, 255, North-Holland Publ. Comp. (1973)
84) H.D. Niall: Peptides: Chemistry and Biochemistry: Proc. 5th Am. Pept. Symp. 1978, 127
85) J. Meienhofer, E. Schnabel, H. Bremer, O. Brinkhoff, R. Zabel, W. Sroka, H. Klostermeyer, D. Brandenburg, T. Okuda & H. Zahn: Z. Naturforsch. 18b, 1120 (1963)

86) P.G. Katsoyannis, K. Fukuda, A. Tometsko, K. Suzuki & M. Tilak: J.Am.Chem.Soc. 86, 934 (1964)
87) Y.T. Kung et al.: Scienta sinica 14, 1710 (1965), 15, 544 (1966)
88) P.G. Katsoyannis, A. Tometsko, G. Zalut, S. Johnson, A.C. Trakatellis, G. Schwarz & J. Ginos: Biochemistry 6, 2635-2668 (1967)
89) H. Zahn: Naturwissenschaften 52, 99 (1965)
90) P. Sieber, B. Kamber, A. Hartmann, A. Jöhl, B. Rinker & W. Rittel: Helv. Chim. Acta 60, 27 (1977), Peptides: Chemistry and Biochemistry: Proc. 4th Am. Pept. Symp. 1975, 477
91) R.G. Hiskey, A. Wittinghofer, A.N. Goud & R.R. Vunnam: Peptides: Chemistry and Biochemistry: Proc. 4th Am. Pept. Symp. 1975, 485
92) R.B. Merrifield & A. Marglin: Peptides 1966, 108, North-Holland Publ. Comp. (1967)
93) H. Zahn, T. Okuda & Y. Shimonishi: Peptides 1966, 85, North-Holland Publ. Comp. (1967)
94) T. Okuda & H. Zahn: Die Makromolekulare Chemie 121, 87 (1969)
95) W. Woiwode: Dissertation Tübingen 1977
96) R. Eberle: Dissertation Tübingen 1979
97) I. Gatfield: Dissertation Tübingen 1975
98) H. Albrecht: Dissertation Tübingen 1978
99) D. Gillessen, E. Schnabel & J. Meienhofer: Liebigs Ann. Chem. 667, 164 (1962)
100) P.G. Katsoyannis & M. Tilak: J. Am. Chem. Soc. 85, 428 (1963)
101) R.E. Reid: J. Org. Chem. 41, 1027 (1976)
102) V. du Vigneaud, L.F. Audrieth & H.S. Loring: J. Am. Chem. Soc. 52, 4500 (1930)
103) E. Wünsch, K. Fries & L. Zwick: Chem. Ber. 91, 542 (1958)
104) H. Eckstein, R.E. Sievers & E. Bayer: Liebigs Ann. Chem. 1973, 1467
105) S. Sakakibara: Bull. chem. Soc. Jp. 41, 1273 (1968)

106) J. Pless & W. Bauer: Angew. Chem. 85, 142 (1973)
107) S. Guttmann & R.A. Boisonnas: Helv. Chem. Acta 41, 1852 (1959)
108) S. Hanby, R. Waley & C. Watson: J. Chem. S oc. 1950, 3259
109) I. Photaki, I. Phocas, J. Taylor-Papadimitrion & L. Zervas: Peptides 1968, 201, North-Holland Publ. Comp. (1968)
110) E. Wünsch & R. Spangenburg: Peptides 1972, 30, North-Holland Publ. Comp. (1973)
111) B. Kamber: Helv. Chim. Acta 54, 927 (1971)
112) D.A. Upson & V.J. Hruby: J. Org. Chem. 41, 1353 (1976)
113) R.G. Hiskex & R.L. Smith: J.Am.Chem.Soc. 90, 2677 (1978)
114) D. Yamashiro, R.L. Nobel & C.H. Li : J. Org. Chem. 38, 3561 (1973)
115) U. Weber & P. Hartter: Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 351, 1384-1394 (1970
116) W. König & R. Geiger: Peptides 1969, 17, North-Holland Publ. Comp. (1971)
117) B. Hemmasi & E. Bayer: THL 1977, 1599
118) H. Zahn & E. Rexroth: Z. Analyt. Chem. 148, 181 (1955)
119) S. Nakaparksin, P. Birell, E. Gil-Av & J. Oro: J. Chromat. Sci. 8, 177 (1970)
120) H. Frank, G.J. Nicholson & E. Bayer: Angew. Chem. 90, 396 (1978)
121) H. Frank, K.D. Haegele & D.M. Desiderio: Analyt. Chem. 49, 287 (1977)
122) E. Bayer & W.A. König: J. Chromat. Sci. 7, 95 (1969)
123) H. Frank, H.J. Chavesdas Neves & E. Bayer: J. Chromat. 152, 357 (1978)
124) H. Frank, G.J. Nicholson & E. Bayer: J. Chromat. 146, 197 (1978)
125) H. Frank, G.J. Nicholson & E. Bayer: J. Chromat. Sci. 15, 174 (1977)

126) W. Woiwode, H. Frank, G.J. Nicholson & E. Bayer: Chem. Ber. 111, 3711 (1978)
127) Yu.U. Mitin & N.P. Zapevalova: Uspekhi Khimii 46, 852 (1977)
128) W. König & R. Geiger: Chem. Ber. 103, 788 + 2024 (1970)
129) M. Itoh: Peptides: Chemistry and Biochemistry: Proc. 3rd Am. Peptd. Symp. 1972, 365
130) P. Sieber, M. Brugger & W. Rittel: Peptides 1969, North-Holland Publ. Comp. (1971)
131) A.W. Williams & G.T. Young: Peptides 1969, 52, North-Holland Publ. Comp. (1971)
132) B. Gutte & R.B. Merrifield: J. Biol. Chem. 246, 1922 (1971)
133) B.W. Erickson & R.B. Merrifield: Peptides: Chemistry and Biochemistry Proc. 3rd Am. Peptd. Symp. 1972, 171
134) R.B. Merrifield, G. Baramy, W.L. Cosand, M. Engelhard & S. Mojsev: Peptides: Chemistry and Biochemistry Proc. 5th Am. Pept. Symp. 1978, 488
135) R.C. Orlowski & R. Walter: J. Org. Chem. 41, 3701 (1976)
136) J.T. Sparrow: J. Org. Chem. 41, 1350 (1976) & Peptides: Proc. 4th Am. Pept. Symp. 1975, 419
137) S.S. Wang: J. Org. Chem. 41, 3258 (1976)
138) E. Atherton, M. Caviezel, H. Over & R.C. Sheppard: J. Chem. Soc. Chem. Comm. 1977, 819
139) J. Blak & C.H. Li: J. Chem. Soc. Chem. Comm. 1976, 504
140) H. Frank & H.P. Hagenmaier: Tetrahedron 30, 2523 (1974)
141) V.J. Hruby, D.A. Upson & N.S. Agarwal: J. Org. Chem. 42, 3552 (1977)
142) A.R. Mitchel, B.W. Erickson, M.N. Ryabtsev, R. Hodges & R. B. Merrifield: J.Am.Chem.Soc. 98, 7357 (1976)
143) G.H. Daub & R.N. Castle: J. Org. Chem. 19, 1577 (1954)
144) M. Kutubuddin: persönliche Mitteilung
145) B.F. Gisin: Helv. Chim. Acta 56, 1476 (1973)
146) B. Hemmasi: persönliche Mitteilung

147) F. Vernon & H. Eccles: Anal. chim. Acta 77, 146 (1975)
148) H. Normant: Angew. Chem. 79, 1029 (1967)
149) S. Sakakibara, Y. Shimonishi, Y. Kishida, M. Okuda & H. Sugihara: Bull. Chem. Soc. Jp. 40, 2164 (1967)
150) S. Sakakibara, Y. Shimonishi & Y. Kishida: Peptides 1966, 45, North-Holland Publ. Comp. (1967)
151) J. Scotcher, R. Lozier & A.B. Robinson: J. Org. Chem. 35, 3151 (1970)
152) S. Matsuura, C.-H. Niu & J.S. Cohen: J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1976, 451
153) D. Martin, A. Weise & H.J. Niclas: Angew. Chem. 79, 340 (1967)
154) W. Schumann: persönliche Mitteilung
155) F.S. Tjoeng, W. Staines, S.St. Pierre & R.S. Hodges: Biochem. Biophys. Acta 490, 489 (1977)
156) F.S. Tjoeng, E.K. Tong & R.S. Hodges: J. Org. Chem. 43, 4190 (1978)
157) M. Mutter: THL 1978, 2839-46
158) R. Oekonomopulos: Dissertation Tübingen 1978
159) N. Greenfield & G. Fasman: Biochemistry 8, 4108 (1969)
160) H. Rosenkranz & A. Domard: Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 352, 896 (1971)
161) M. Rinaudo & A. Domard: J.Am.Chem.Soc. 98, 6360 (1976)
162) Y.-H. Chen, J.T. Yang & K.H. Chau: Biochemistry 13, 3350 (1974)
163) M. Mutter, H. Mutter, R. Uhmann & E. Bayer: Biopolymers 15, 917 (1976)
164) M. Mutter, H. Mutter & E. Bayer: Peptides: Chemistry and Biochemistry: Proc. 5th Am. Pept. Symp. 1978, 403 (1977)
165) M. Mutter: Macromolecules 10, 1413 (1977)
166) H. Mutter: Dissertation Tübingen 1978
167) C. Toniono, G.M. Bonora & M. Mutter: J.Am.Chem.Soc. 101, 450 (1979)
168) P.Y. Chou & G.D. Fasman: Biochemistry 13, 211 (1974), 13, 222 (1974)

169) Y.P. Myer: Res. Commung. Chem. Phatol. Pharmacol. 1, 607 (1970)
170) J.B. Stothers: C-13 NMR-Spektroskopy, Academic Press New York 1972
171) Pretsch. Clerc, Seibl & Simon: Strukturaufklärung organischer Verbindungen, Springer Verlag Heidelberg 1976
172) E. Breitmaier & W. Voelter: C-13 NMR-Spektroskopy Verlag Chemie 1974
173) K. Zech: Dissertation Tübingen 1973
174) K. Okamoto, R.S. Rapaka & D.W. Urry: Biopolymers 17, 573 (1978)
175) C. Gratwohl & K. Wüthrich: Biopolymers 15, 2025 (1976)
176) J. Feeney, P. Partington & G.C.K. Roberts: J. Magn. Reson. 13, 268 (1974)
177) R. Deslauries, G. Levy, W.H. McGregor, D. Sarantakis & I.C.P. Smith: Eur. J. Biochem. 75, 343 (1977)
178) G. Schilling & H.R. Krickeldorf: Makromol. Chem. 178, 885 (1977)
179) I.C.P. Smith, R. Deslauriers & R. Walter: Peptides: Chemistry and Biochemistry: Proc. 3rd, Am.Pept.Symp. 1972, 29
180) W. Voelter, G.Jung, E. Breitmaier & E. Bayer: Z. Naturforsch. 26b, 213 (1971)
181) D.W. Urry, M.M. Long & L.W. Mitchel: Peptides: Chemistry and Biochemistry: Proc. 4th Am.Pept. Symp. 1975, 113
182) I.C.P. Smith & R. Deslauriers: Peptides: Chemistry and Biochemistry: Proc. 4th Am.Pept.Symp. 1975, 97
183) O. Convert, J.H. Griffin, C. di Bello, P. Nicholas & P. Cohen: Biochemistry 16, 3668 (1977)
184) H. Mauser & J. Polster: Z. Phys. Chemie, neue Folge 91, 108 (1974)
185) J. Polster: Dissertation Tübingen 1974
186) H. Mauser: Z. Naturforsch. 23b, 1021-1030 (1968)

187) H. Lachmann, H. Mauser, F. Schneider + H. Wenck: Z. Naturforsch. 26b, 629 (1971)
188) H.J. Niemann & H. Mauser: Z. Phys. Chem. neue Folge 82, 295 (1972)
189) H. Mauser, G. Gauglitz & H. Niemann: Z. Phys. Chem. neue Folge 82, 309 (1972)
190) E. Bayer, M. Mutter, J. Poster & R. Uhmann: Peptides 1974, 129, North-Holland Publ. Comp. Amsterdam (1975)
191) E. Bayer, M. Mutter, R. Uhmann, J. Polster & M. Mauser: J.Am.Chem.Soc. 96, 7333 (1974)
192) E. Mc. C. Arnett, J.G. Miller & A.R. Day: J.Am.Chem. Soc. 72, 5635 (1950)
193) E. Mc. C. Arnett, J.G. Miller & A.R. Day: J.Am.Chem. Soc. 73, 5393 (1951)
194) Yu. I. Kurgin, M.G. Dmitrieva: Dokl. Akad. Nauk. SSSR 143, 629 (1962)
195) Yu. I. Kurgin, M.G. Dmitrieva & E.D. Kaverzneva: Tr. Konf. po Probl. Primeneiya Korrelayasion Uravnennii v. Organ. Khim. Tartusk Gos. Univ., Tartu 2, 89 (1962)
196) J.R. Knowles & C.A. Pearson: J.Chem.Soc.Chem. Commun. 1967, 755
197) P.W. Arana, C.W. Su & J.W. Watson: J.Chem.Soc. D 1970, 363
198) A. Schüttler, W. Meltzow, J. Föhles & H. Zahn: Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 741 (1976)
199) L. Kisfaludy, M. Löw, G.Y. Argay, M. Czugler, T. Kömives, P. Sohar & F. Darvas: Peptides 1976, 55, North-Holland Publ. Comp., Amsterdam (1976)
200) Y.I. Kurgin & M.G. Dmitrieva: Tetrahedron 21, 2305 (1965)
201) W. König & R. Geiger: Peptides: Chemistry and Biochemistry: Proc. 3rd Am. Pept. Symp. 1972, 343
202) J. Kovacs, L. Kisfaludy, M.Q. Ceprini & R.H. Johnson: Tetrahedron 25, 2555 (1969)

203) J. Kovacs, R.E. Cover, R.H. Johnson, T.J. Kalas, G.L. Mayers & J.E. Roberts: J. Org. Chem. 38, 2518 (1973)
204) D.S. Kemp, S.L. Hsia-Choong & J. Pekaer: J. Org. Chem. 39, 3841 (1974)
205) D.S. Kemp: Peptides 1971, 1, North-Holland Publ. Comp. Amsterdam (1973)
206) K. Inouye, K. Watanabe & M. Shin: J.Chem.Soc. Perkin I, 1977, 1905
207) J. Kovacs, G.L. Mayers, R.H. Johnson, R. Gianotti, H. Cortegiano & J. Roberts: Peptides: Chemistry and Biochemistry: Proc. Am. Peptd. Symp. 2nd 1970, 185 (1972)
208) N.M. Oleinik, Yu. Si, L.M. Litvinenko, L.Ya. Tkacheva: Zh. Org. Khim. 10, 2553 (1974)
209) A.W. Williams & G.T. Young: J.Chem.Soc. Perkin I, 1972, 1194
210) J. Kovacs, E.J. Davis, R.H. Johnson, H. Cortegiano & J. Roberts: Peptides: Chemistry and Biochemistry: Proc 3rd Am. Peptid Symp. 1972, 359
211) J. Kovacs, R. Cover, G. Jham, Y. Hsieh & T. Kalas: Peptides: Chemistry and Biochemistry: Proc. 4th Am.Pept. Symp. 1975, 317
212) J. Kovacs, Y. Hsieh, K.Y. Hui & S.E.Kim: Peptides: Chemistry and Biochemistry: Proc. 5th Am. Peptd. Symp. 1978, 461
213) V.Gut: Collection Czech. Chem. Commun. 40, 129 (1975)
214) S.A. Khan & K.M. Sivanandaiah: Synthesis 1976, 614
215) S. Karlsson, G. Lindberg & U. Ragnarsson: Acta Chem. Scand. 24, 337 (1970)
216) U. Ragnarsson, S. Karlsson & B. Sandberg: Acta Chem. Scand. 25, 1487 (1971)
217) G. Losse & R. Ulbrich: Peptides 1972, 153 North-Holland Publ. Comp. Amsterdam (1973), Tetrahedron 28, 5833 (1972)
218) M. Bodanszky & R.J. Bath: J.Chem.Soc.Chem.Commun. 1969, 1259

219) K. Lübke: Peptides 1969, 154, North-Holland Publ. Comp. Amsterdam (1971)
220) K. Kovacs & B. Peuke: Peptides 1972, 187, North-Holland Publ. Comp. Amsterdam (1973)
221) H. Wissmann, W. König & R. Geiger: Peptides 1972, 158, North-Holland Publ. Comp. Amsterdam (1973)
222) M. Bodanszky, R.J. Bath, A. Chang, M.L. Fink, K.W. Funk, S.M. Greenwald & Y.S. Klausner: Peptides: Chemistry and Biochemistry: Proc. 3rd Am. Pept. Symp. 1972, 203
223) H.P. Hagenmaier: THL 1970, 283
224) V. Gut & J. Rudinger: Peptides 1968, 185, North-Holland Publ. Comp. Amsterdam (1968)
225) J. Rudinger & P. Buetzer: Peptides 1974, 211, North-Holland Publ. Comp. Amsterdam (1975)
226) A. Losse: THL 1971, 4989; Tetrahedron 29, 1203 (1973)
227) J.J. Maher, M.E. Furey & L.J. Greenberg: THL 1971, 27
228) C.J. Pedersen: J. Am. Chem. Soc. 89, 7017 (1967)
229) F. Vögtle & P. Neumann: Chem. Ztg. 97, 600 (1973)
230) J.J. Christensen, J.O. Hill & R.M. Izatt: Science 174, 459 (1971) + Chemical Rev. 74, 351 (1973)
231) C.J. Pedersen & H.K. Frensdorff: Angew. Chem., Int. Ed. Engl. 11, 16 (1972)
232) G.W. Gokel & H.D. Durst: Aldrichimica Acta 9, 3-12 (1976) + Syntheses 1976, 168
233) F. Vögtle & H. Sieger: Angew. Chem. 89, 410 (1977)
234) B. Tümmler, G. Maass, E. Weber, W. Wehner & F. Vögtle: J. Am. Chem. Soc. 89, 4683 (1977)
235) C.J. Pedersen: J. Am. Chem. Soc. 92, 386 (1970)
236) F. Vögtle & E. Weber: Kontakte 1/77, 11, 2/77, 16, 3/77, 36, 2/78, 16
237) W. Raßhofer, G. Oepen & F. Vögtle: Chem. Ber. 111, 419 (1978)
238) E. Blasius, W. Adrian, K.P. Jansen & G. Klaudke: J. Chromat. 96, 89 (1974)
239) P.R. Danesi, H. Meider-Gorican, R. Chiarizia, W. Capuano & G. Scibona: Proc.Int.Solv.Extr.Conf.2, 1761 (1974)

240) Y.S. Klausner & M. Chorev: J. Chem. Soc. Perkin I 1977, 627 + J. Chem.Soc.Chem.Commun. 1976 596
241) R.W. Röske & P.D. Gesellchen: THL 1976, 3369
242) J.P. Tam, W.F. Cumingham-Rundles, B.E. Erickson & B. Merrifield: THL 1977, 4001
243) G. Moore & D. Mc Master: Peptides: Chemistry and Biochemistry: Proc. 5th Am. Pept. Symp. 1978, 518
244) G. Karagonnis & J.P. Agathokli: Prakt. Akad. Athenon 1970, 45, 118 (1971)
245) H. Sieger & E. Vögtle: THL 1978, 2709
246) H. Tadokoro: Makromol. Rev. 1, 119 (1967)
247) G.G. Hammes & P.R. Roberts: J. Am. Chem. Soc. 90, 7119 (1968)
248) H. Tadokoro, T. Yoshihara, Y. Chatani & S. Murahashi: Polymer Letters 2, 363 (1964)
249) A. Blumberg, S. Pollack & C.J. Hoeve: J. Polymer Sci: Part A-2, 4, 2499 (1964)
250) A. Blumberg & J. Wyatt: Polymer Letters 4, 653 (1966)
251) M. Yokoyama, H. Ishihara, R. Iwamoto & H. Tadokoro: Macromolecules 2, 184 (1968)
252) R. Iwamoto, Y. Saito, H. Ishihara & H. Tadokoro: J. Polymer Sci: Part A-2, 6, 1509 (1968)
253) G. Chaput & G. Jeminet: Can. J.Chem. 53, 2240 (1975)
254) R.D. Lundberg, F.E. Bailey & R.W. Callard: J. Polymer Sci: Part A-1, 4, 1563 (1966)
255) K.J. Liu: Makromol. Chem. 116, 146 (1968) + Macromolecules 1, 213 (1968)
256) K.J. Liu & J.E. Anderson: Macromolecules 1, 308 (1968)
257) A. Hirao, S. Nakahama, M. Takahashi & N. Yamazaki: Makromol. Chem. 179, 915 (1978).
258) L. Carpino: J. Am. Chem. Soc. 81, 955 (1959)
259) E. Schnabel: Liebigs Ann. Chem. 702, 188 (1967)
260) J.M. Stewart & J.D. Young: "Solid Phase Peptide Synthesis" W.H. Freeman, San Fransisco Californ. 1969, 30

261) C.H. Lid, D. Yamashiro & S. Lemaire: Biochemistry 14, 953 (1975)
262) W. König & R. Geiger: Chem. Ber. 103, 2041 (1970)
263) K. Bürger: Z. Anal. Chem. 196, 251 (1963) und 224, 421 (1967)
264) H. Zahn & R. Zabel: Liebigs Ann. Chem. 659, 163 (1962)
265) G.H. Daub & R.N. Castle: J. Org. Chem. 19, 1577 (1977)
266) D. Leibfritz, W. Mayr, R. Oekonomopulos & G. Jung: Tetrahedron 34, 2045 (1978)

Nachstehenden Damen und Herren möchte ich für ihre Mitarbeit herzlich danken:

Frau Margit Wizemann gilt mein besonderer Dank für die zahlreiche Unterstützung für das Zustandekommen dieser Arbeit.

Frau Gisela Oehling und Frau Steffi Naumann danke ich für die Durchführung der Aminosäureanalysen.

Herrn Klaus Albert danke ich für die Aufnahme der C-13 NMR-Spektren.

Herrn Wurmstich danke ich für die Durchführung der Elementaranalysen.

Fräulein Gisela Köllner danke ich für die Aufnahme der CD-Spektren.

Fräulein Förstel danke ich für die Aufnahme der IR-Spektren.

LEBENSLAUF

Wolfgang Schoknecht

05.10.1948	in Möllenbeck geboren Eltern: Franz Schoknecht, Gärtner Elsbeth Schoknecht geb. Senitz
01.09.1955	Einschulung in die Grundschule Möllenbeck
01.09.1959	Wechsel auf die Polytechnische Oberschule in Ziegendorf
17.02.1961	Flucht aus der DDR nach Westberlin
10.04.1961	Besuch des Gymnasiums in Schwenningen
01.06.1969	Ablegung der Reifeprüfung
01.10.1969	Aufnahme des Studiums Chemie an der Universität Tübingen
01.07.1974	Mündliche Diplomhauptprüfung
August 74 bis Mai 76	Experimenteller Teil des Diploms. Der lange Zeitraum wird dadurch verständlich, daß die Arbeit durch eine langwierige Krankheit unterbrochen wurde.
Juni 1976 bis Juni 1979	Experimenteller Teil der Doktorarbeit: Untersuchungen über die Anwendung der Liquid-Phase-Peptidsynthese am Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen unter Leitung von Herrn Professor Dr. Ernst Bayer

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten:

E. Bayer, W. Braun, E. Breitmaier, G. Häfelinger, R. Hamm, H. Hagenmaier, M. Hanack, G. Jung, S. Kemmler-Sack, D. Krug, H. Krüger, G. Kortüm, W. Kraus, E. Lindner, I.P. Lorenz, H. Mauser, E. Müller, D. Oelkrug, G. Opitz, H. Pauschmann, A. Rieker, W. Rundel, W. Rüdorff, F. Seelig, H. Stegmann, H. Suhr, E. Stumpp, W. Voelter, W. Zeil.

Offsetdruck
GmbH & Co. KG.
86 Bamberg Hohe-Kreuz-Str. 9b

M. SCHADEL
» Tel. 0951/54414 » 58461 «